



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

**Acción biocontroladora de tres especies de  
*Trichoderma* frente a *Cercospora asparagi* Sacc. en el  
cultivo de *Asparagus officinalis* L. (Espárrago)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en  
Microbiología y Parasitología

**AUTOR**

Edwars Jimmy PILLACA TANTA

**ASESOR**

Mg. Jorge LEÓN QUISPE

Lima, Perú

2019

Porque la perseverancia y las ganas de  
de hacer bien las cosas, conllevan a las metas  
trazadas.

Con amor a mis dos razones de ser, Sofía y Jacquelin,  
También a mis padres Moisés e Isabel porque creyeron en este proyecto.

A mis hermanos Herny y Gina

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor el profesor Mg. Jorge León Quispe, por el apoyo desinteresado y los sabios consejos que me llevaron a culminar mi trabajo.

A la MSc. Elizabeth Nuñez Zacarías, quien confió en mí para la realización de este importante proyecto, además de toda la experiencia transmitida a lo largo de la estadía en los laboratorios de la Subdirección Control Biológico del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), en el área de Manejo Integrado de Plagas.

Al Ing. Dante Mendoza, por las enseñanzas de campo y los criterios impartidos para la realización de este proyecto.

Al Tco. Angel Ramos, por la experiencia transmitida y el apoyo dado.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APG III	del inglés Angiosperm Phylogeny Group, o sea, “grupo para la filogenia de las angiospermas”. Esta versión sucede y reemplaza a aquellas publicadas en 1998 (denominada APG I) y en 2003 (APG II).
B	Brote.
BCA	del inglés Biological Control Agents (Agente de Control Biológico).
C	Corona.
<i>e.g.</i>	abreviatura en latín de <i>exempli gratia</i> , que en español significa "por ejemplo".
<i>et al</i>	del latín <i>et alii</i> , abreviada como <i>et al.</i> , que significa “y otros”.
Ev	Evaluación.
I	Incidencia.
Mn	Mancha necrótica.
S	Surco.
s.f.	sin fecha.
TaMn	tallos con manchas necróticas.
TTa	total de tallos (con manchas necróticas + sanos)
Trat	Tratamiento.

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Diferencias entre el <i>Cercospora asparagi</i> y especies de <i>Stemphyllium</i> . (González y del Pozo, 1999; Sánchez y Apaza, 2000; Núñez, 2005; Sánchez y Sánchez, 2008; Limgroup, 2013 y Phengsintham, <i>et al.</i> , 2013).	11
<b>Tabla 2.</b> Escala de Evaluación de <i>C. asparagi</i> adaptado de Sánchez y Apaza (2000).	23
<b>Tabla 3.</b> Fechas de las evaluaciones realizadas.	31
<b>Tabla 4.</b> Número de Manchas Necróticas por tallo, sus promedios y medias en los 6 Tratamientos (T1: <i>T. viride</i> , T2: <i>T. harzianum</i> , T3: Control, T4: 3 especies de <i>Trichoderma</i> , T5: <i>T. virens</i> y T6: 3 especies de <i>Trichoderma</i> más sustrato).	32
<b>Tabla 5.</b> Incidencia de la enfermedad para la primera evaluación (a 2 días de la atomización de las especies de <i>Trichoderma</i> ), para cada tratamiento y para el recuento total de tallos.	33
<b>Tabla 6.</b> Severidad de la enfermedad en grados para el promedio de manchas necróticas de las evaluaciones.	34
<b>Tabla 7.</b> Fechas de evaluación y atomización de las tres especies de <i>Trichoderma</i> .	34
<b>Tabla 8.</b> Valores de Dureza y pH del agua usada para las aplicaciones.	34
<b>Tabla 9.</b> Significancia mediante el test de Kruskal Wallis entre el control (3) y los tratamientos 1,2 y 5 ( <i>T. viride</i> , <i>T. harzianum</i> y <i>T. virens</i> respectivamente) para la tercera evaluación.	35

<b>Tabla 10.</b> Fechas de las actividades en los tratamientos con los consorcios y el sustrato.	36
<b>Tabla 11.</b> Significancia mediante el test de Kruskal Wallis entre el control (tratamiento 3), el consorcio de 3 especies de <i>Trichoderma</i> (tratamiento 4) y el mismo consorcio más sustrato (tratamiento 6) para la tercera evaluación.	36

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Descripción morfológica de <i>Asparagus officinalis</i> L. (Núñez, 2005).	5
<b>Figura 2.</b> Desarrollo fenológico de <i>Asparagus officinalis</i> L. (Núñez, 2005).	6
<b>Figura 3.</b> <i>Cercospora asparagi</i> 1,6 y 7. Estromas con conidióforos adheridos. 2-3. Conidióforos. 4,5 y 8. Conidias. (Phengsintham <i>et al</i> , 2013).	8
<b>Figura 4.</b> Ciclo de <i>Cercospora asparagi</i> (Núñez, 2005).	12
<b>Figura 5.</b> Mapa de ubicación de la Empresa Agrícola Copacabana (Google maps, s.f., recuperado el 29 de enero del 2019) donde se realizó el ensayo.	19
<b>Figura 6.</b> Vista panorámica del área total del ensayo (Agrícola Copacabana, Chíncha-Ica).	20
<b>Figura 7.</b> Etapas fenológicas de <i>Asparagus officinalis</i> L. (Núñez, 2005) consideradas en el desarrollo del ensayo.	21
<b>Figura 8.</b> Distribución de los tratamientos en el ensayo, a. Orden de los tratamientos en campo con la descripción de cada tratamiento. b. Borde con broza infestada al lado del camino, alrededor de todo el ensayo existía una plantación con síntomas iniciales de la enfermedad como muestra también en la Figura 6. c. Características de cada tratamiento: los cuadrados representa la posición de cada corona en el surco aporcado (Anexo 7), en los cuadros amarillos se marcó un brote para su evaluación.	25

<b>Figura 9.</b> Delimitación de los tratamientos (a) y marcado de los brotes de la corona en los tratamientos (b).	26
<b>Figura 10.</b> Mezcla (a), fermentación (b) e incorporación del sustrato con hongos (c).	28
<b>Figura 11.</b> Manchas necróticas de <i>C. asparagi</i> .	29
<b>Figura 12.</b> <i>Cercospora asparagi</i> , a. Manchas necróticas, mostrando la forma y coloración característica, en un tallo de espárrago, b. Dibujos de conidias de <i>Cercospora asparagi</i> , observando su forma filiforme y multiseptadas.	30
<b>Figura 13.</b> Desarrollo del cultivo durante el ensayo, a: Inicio, b: 2 semanas y c:3 semanas.	31
<b>Figura 14.</b> Diferencias en el promedio de número de manchas necróticas entre los tratamientos: Control, <i>T. viride</i> , <i>T. harzianum</i> , y <i>T. virens</i> , puede observarse el promedio menor para el tratamiento con <i>T. viride</i> con respecto a los demás tratamientos.	35
<b>Figura 15.</b> Diferencias en el promedio de número de manchas necróticas entre los tratamientos: Control, <i>T. viride</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>T. virens</i> y <i>T. viride</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>T. virens</i> + sustrato, puede observarse el promedio menor para el tratamiento con sustrato.	37
<b>Figura 16.</b> Diagrama de caja para muestras independientes entre el control y el consorcio más el sustrato, donde puede observarse la diferencia de los datos acumulados.	37
<b>Figura 17.</b> Condiciones Ambientales (gotas de rocío), en el mes de junio ocurrieron continuas lloviznas acumulando 4.4 L/m <sup>2</sup> .	38



## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- MARCO TEÓRICO	4
2.1 DESCRIPCIÓN DE <i>Asparagus officinalis</i> “espárrago”	4
2.1.1 Clasificación taxonómica	6
2.1.2 Fenología del cultivo	6
2.2 DESCRIPCIÓN DEL PATÓGENO <i>Cercospora asparagi</i>	7
2.2.1 Clasificación taxonómica	8
2.2.2 Patología	9
2.2.3 Comparación con el género <i>Stemphyllium</i> .	9
2.2.4 Ciclo de la enfermedad	10
2.2.5 Importancia de la enfermedad	12
2.2.6 Incidencia y severidad	13
2.3 DESCRIPCIÓN DEL BIOCONTROLADOR <i>Trichoderma</i>	13
2.3.1 Clasificación taxonómica	14
2.3.2 Mecanismos de acción	15
2.3.2.1 Competencia	15
2.3.2.2 Micoparasitismo	16
2.3.3.3 Antibiosis	16
2.3.3 Desarrollo de consorcios compatibles	17

<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	18
3.1 HIPÓTESIS	18
3.2 OBJETIVO GENERAL	18
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	19
4.1 LUGAR DE ENSAYO	19
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO	20
4.2.1 Hongos antagonistas	20
4.2.2. Hongo fitopatógeno	20
4.2.3. Material vegetal	20
4.3 IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO <i>Cercospora asparagi</i> EN EL CULTIVO DE <i>Asparagus officinalis</i> .	21
4.3.1 Procesamiento de las muestras	22
4.3.2 Determinación de la incidencia y severidad	22
4.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA EN CAMPO DE TRES ESPECIES DE <i>Trichoderma</i> ( <i>T. viride</i> , <i>T. harzianum</i> y <i>T. virens</i> )	23
4.4.1 Propagación de los hongos antagonistas	23
4.4.2 Ensayo de aplicación en campo	24
4.5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA EN CONJUNTO DE TRES ESPECIES DE <i>Trichoderma</i> , INCORPORANDO UNA MEZCLA DE PAJILLA DE MAÍZ	27
4.6 METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	28
4.7 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	29
<b>V. RESULTADOS</b>	30
5.1 IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO <i>Cercospora asparagi</i>	30

5.2 EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE <i>Cercospora asparagi</i> .	30
5.3 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS TRES ESPECIES DE <i>Trichoderma</i> POR SEPARADO FRENTE AL CONTROL	34
5.4 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS TRES ESPECIES DE <i>Trichoderma</i> EN CONJUNTO Y CON SUSTRATO FRENTE AL CONTROL	36
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	39
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	48
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b>	49
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	50
<b>X.- ANEXOS</b>	60

## **I.- RESUMEN**

El control biológico es una de las alternativas ante el creciente uso de pesticidas para combatir fitopatógenos en los principales cultivos de exportación. Este es el caso del cultivo de *Asparagus officinalis* “espárrago” donde se puede utilizar biocontroladores en el manejo del patógeno *Cercospora asparagi*, cuya afectación es importante y donde el manejo convencional trae resistencias a los productos utilizados. Se determinó la capacidad biocontroladora de 3 especies del género *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens*) frente al fitopatógeno *Cercospora asparagi* en un campo sembrado con espárrago sobre tejidos afectados por el fitopatógeno, en un área de cultivo de 2500 m<sup>2</sup>. Se aplicó la suspensión de los hongos biocontroladores divididos en 6 tratamientos sobre el área donde empezaba a brotar el espárrago; además se incorporó una mezcla de pajilla de maíz con el sustrato de la producción de los hongos antagonistas para uno de los tratamientos; el tratamiento que tenía las tres especies *Trichoderma*, donde se le incorporó además el sustrato sobrante de las atomizaciones, presentó una significancia (0.041) frente al control. Se concluye que en su conjunto las 3 especies de *Trichoderma* tienen una acción biocontroladora reduciendo las manchas necróticas producidas por el patógeno, permitiendo establecer su potencial uso en un plan de manejo integrado.

**Palabras Claves:** Fitopatógeno, biocontrolador, cultivo de exportación, *Trichoderma*.

## I.- SUMMARY

Biological control is one of the alternatives to the growing use of pesticides to combat phytopathogens in the main export crops. This is the case of the cultivation of *Asparagus officinalis* "asparagus" where biocontrollers can be used in the management of the pathogen *Cercospora asparagi*, whose affectation is important and where conventional management brings resistances to the products used. The biocontrolling capacity of 3 species of the genus *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum* and *T. virens*) was determined against the phytopathogen *Cercospora asparagi* in a field planted with asparagus on tissues affected by the phytopathogen, in a cultivation area of 2500 m<sup>2</sup>. The suspension of the biocontroller fungi divided into 6 treatments was applied on the area where the asparagus started to sprout; in addition, a mixture of corn straw with the substrate of the production of the antagonist fungi was incorporated for one of the treatments; the treatment that the three *Trichoderma* species had, where the surplus substrate of the sprays was also incorporated, had a significance (0.041) compared to the control. It is concluded that all 3 species of *Trichoderma* have a biocontrolling action reducing the necrotic spots produced by the pathogen, allowing to establish its potential use in an integrated management plan.

**Key Words:** Phytopathogen, biocontroller, export culture, *Trichoderma*.

## I.- INTRODUCCIÓN

Las limitaciones en el uso de pesticidas debido a su residualidad en el producto final, han provocado que empresas del rubro agrícola busquen alternativas como el control biológico, que desde 1995 por aumento de las exportaciones en particular del espárrago, está siendo utilizado para afrontar problemas fitosanitarios, como elemento del manejo integrado, Bettiol *et al.*, 2014.

El espárrago es considerado un cultivo de exportación de gran importancia, posicionando al mercado peruano entre los principales países que proveen alimento al mundo, así informó El Ministerio de Agricultura y Riego (Minagri, 2018) que Perú fue importante exportador de espárragos al mundo.

En el período de enero a febrero del 2018, ha existido un incremento en exportaciones de espárrago del 25%, con respecto al año anterior, siendo hasta este mes la cantidad exportada de 13,120,012 Kg. (US\$ FOB 48,015,437), además los países de destino de espárrago fresco del mes de febrero fueron de 53% para Países Bajos, del 15% para España y Estados Unidos con un 9%. Para noviembre del 2018 se exportó 16,067,862 kilos de espárrago fresco, frente a los 15,041,708 del 2017 para el mismo mes (AGRODATAPERU, 2018 e Instituto Peruano del Espárrago y Hortalizas, 2018).

Existen diferentes patógenos que afectan al espárrago como: *Cercospora asparagi*, *Puccinia asparagi*, *Stemphylium botryosum*, *Stemphylium vesicarium* y *Fusarium oxysporum* que interfieren con la fotosíntesis, ya que atacan tejidos superficiales, ocasionando un inadecuado desarrollo de la planta, con la consecuente disminución de la

producción. En el control de estas enfermedades se está utilizando principalmente agroquímicos, entre ellos: clorotalonil, ditiocarbamatos, benzimidazoles, triazoles, azufre e hidróxidos de cobre, como los más usados (Sánchez y Apaza, 2000 y Cabrera, 2017).

*Trichoderma* es un género usado como agente de biocontrol por su acción antagónica, tiene gran importancia en el sector agrícola gracias a las diversas ventajas que ofrece, ya que protege a las plantas del ataque de fitopatógenos del fruto, foliares y del suelo causantes de enfermedades de importancia económica en diferentes cultivos, probados en condiciones de laboratorio, invernadero y campo (Arzate *et al.*, 2006; Bettiol, 2006; Tovar, 2008; Blaszczyk *et al.*, 2014 y Rodríguez y Flores, 2018).

Acuña (2006) estudio la actividad *in vitro* e *in vivo* de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el control de *Stemphylium vesicarium* un fitopatógeno que produce una sintomatología similar a la producida por *Cercospora asparagi* en el cultivo de espárrago; asimismo Lartey *et al.*, (2010) utilizaron *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma aureoviride* *in vitro* en el control de *Cercospora beticola* en el cultivo de remolacha. Ambos estudios señalan que estos microorganismos tienen potencialidad en el manejo de enfermedades.

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), es un ente del estado que regula el control biológico en el Perú, a través de la subdirección de Control Biológico, su objetivo es fomentar el uso del control biológico en cultivos como el espárrago que tienen gran importancia económica; en el área de hongos antagonistas se vienen realizando estudios para el control de moniliasis en cacao, *Fusarium* en flores ornamentales y *Botrytis* en tomate, usando las especies: *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens*. (Bettiol *et al.*, 2014).

Los sistemas adoptados en la agricultura y el uso irracional de productos químicos han producido una disminución de la diversidad en diferentes ecosistemas, provocando el aumento de plagas y enfermedades, adicionándose los incidentes de salud, producto del uso y fabricación de agroquímicos, todo ello obliga a usar alternativas que sean sostenibles (Zavaleta, 2000).

Las enfermedades en general se presentan principalmente en zonas de gran humedad y en épocas de precipitaciones elevadas; *Cercospora asparagi* no es la excepción, produciendo costos elevados en el gasto de fungicidas para su manejo, ya que es muy agresivo y evita el desarrollo adecuado de la planta, siendo las estructuras que afecta brotes y filocladios (tallos modificados a manera de hojas). *C. asparagi* comenzó afectar las plantaciones en los valles costeros centrales como Huaral, Cañete y Chíncha, encontrándose en la actualidad disperso por todas las zonas esparragueras (costa de Piura, La Libertad, Ancash, Lima, Ica y Arequipa), (Sánchez y Apaza, 2000 y Núñez, 2005).

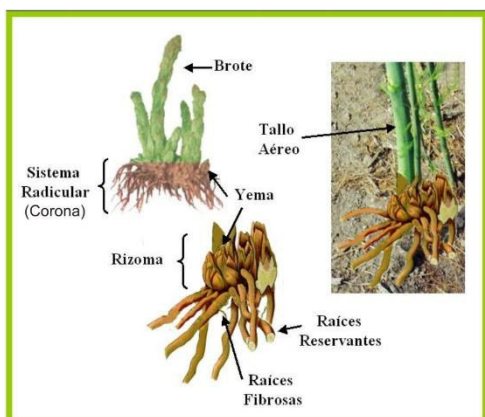
El presente trabajo pretende encontrar una alternativa en el manejo del fitopatógeno *C. asparagi*, con el uso de antagonistas del género *Trichoderma* en el cultivo del espárrago.



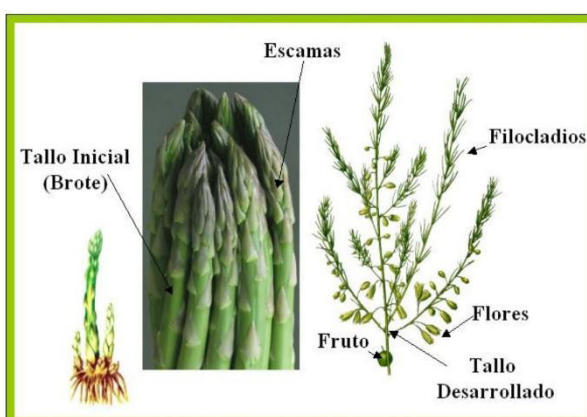
## II.- MARCO TEÓRICO

### 2.1 DESCRIPCIÓN DE *Asparagus officinalis* “espárrago”

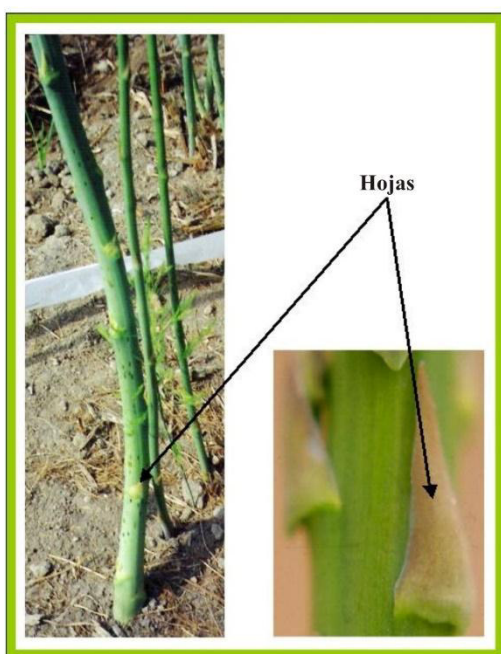
*Asparagus officinalis* L. (espárrago) (Figura 1), es una planta herbácea, de grueso rizoma, dioca y que presenta doble fecundación. El conjunto de raíces fibrosas, cilíndricas y yemas iniciales, forman una estructura irregular, que se extiende mientras va alcanzando mayor edad, esta estructura es conocida como corona. El tallo se inicia en las yemas de la corona, que al crecer darán origen a los tallos carnosos no ramificados, conocidos como turiones, estos contienen las hojas que se encuentran dispuestas a su alrededor, se formaran tallos secundarios los cuales tienen verticilos que están cubiertos de filocladios (tallos modificados), estas conforman el follaje de la planta madura. Las flores cuelgan de un delgado pedúnculo y presentan un color que va desde el verde claro al amarillo verdoso, con una característica forma de campana, siendo sus dimensiones de 5-8 mm las femeninas y 3-5 mm las masculinas, ambas con presencia de estigmas y estambres, estando el estigma atrofiado en las masculinas y los estambres sin desarrollo completo en las femeninas. La flor masculina presenta seis estambres y la flor femenina tres pistilos. El fruto es redondeado con tres lóculos con 1-2 semillas en cada uno, presentando un color verde al inicio volviéndose rojo al madurar y de 8 mm de diámetro aproximadamente. La actividad fotosintética origina la síntesis de glucosa fructuosa y sacarosa, que son trasladados al sistema radicular y almacenados en la forma fructo-oligosacáridos, dependiendo de esta reserva la cantidad de turiones que produzca en la etapa de cosecha. Se adapta a diferentes ambientes que van desde climas desérticos como el norte de México y Perú, mediterráneos como Chile central y California, marinos como el sur de Chile, Nueva Zelanda e Inglaterra y templados fríos como Polonia entre otros (González y del Pozo, 1999; Núñez, 2005).



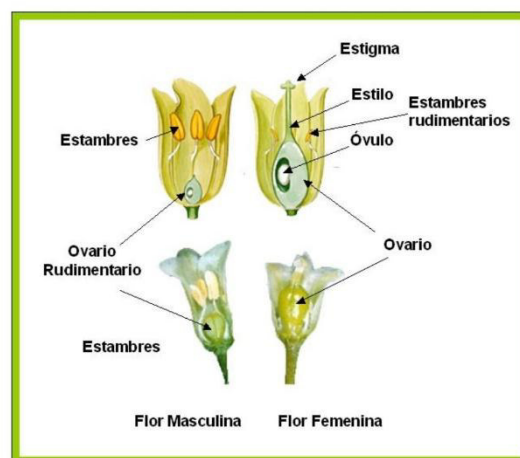
Sistema radicular del espárrago.



El tallo del espárrago y sus partes.



Ubicación de las hojas



Partes de las flores.



El fruto del espárrago.

**Figura 1.** Descripción morfológica de *Asparagus officinalis* L. (Núñez, 2005).

### 2.1.1 Clasificación Taxonómica

*Asparagus officinalis* fue caracterizada por Carl Linneo y publicado en su libro *Species Plantarum* (Linneo 1753).

La clasificación se tomó de la propuesta APG III (Gonzáles y López, 2012), de las publicaciones de Haston *et al.*, (2009) y Stevens (2010).

Grupo Angiosperma

Clase Monocotiledóneas

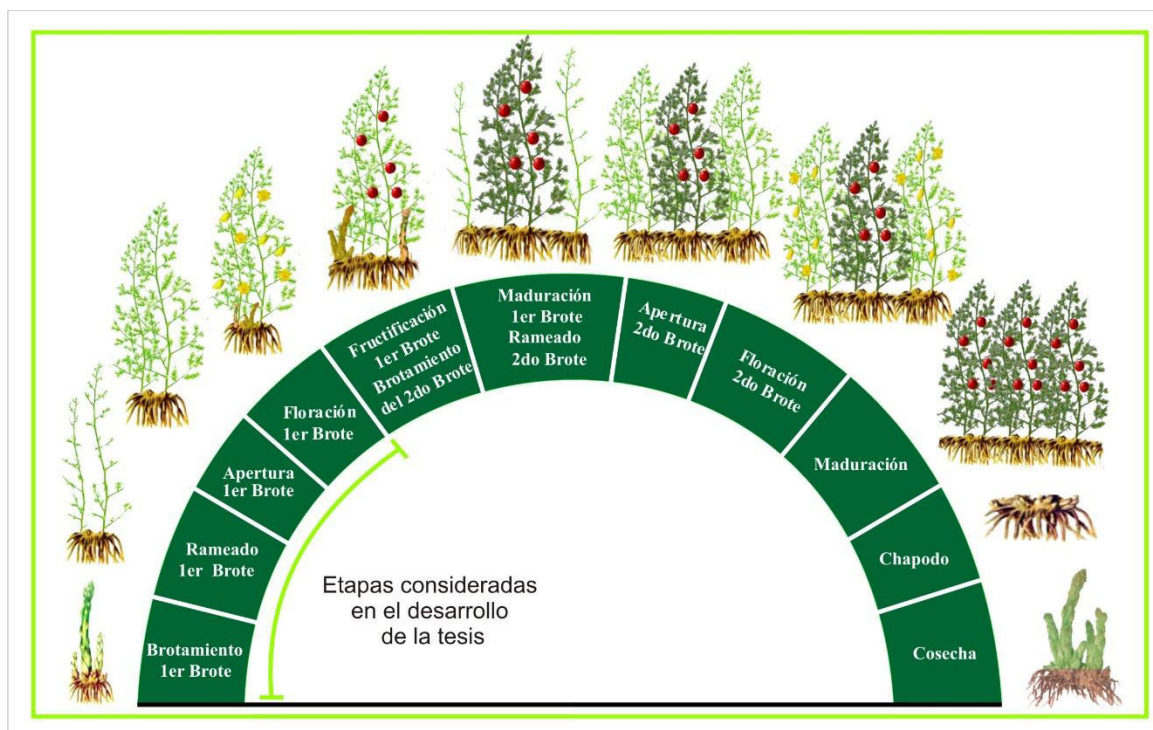
Orden Asparagales

Familia Asparagaceae.

Especie *Asparagus officinalis* L.

### 2.1.2 Fenología del cultivo

El desarrollo fenológico del cultivo de *A. officinales* según Núñez (2005) se describe en la Figura 2.



**Figura 2.** Desarrollo fenológico de *Asparagus officinalis* L. (Núñez, 2005).

**Brotamiento.-** Ocurre después de un corte total de tallos, originando la aparición de los brotes desde de la corona. Estos brotes son los productos que se venderán. Ya no se considera brote cuando pierde su forma y da paso al desarrollo de la planta.

**Ramificación.-** Aparición de ramas que salen del brote.

**Apertura de filocladios.-** Estos se abren en las ramas formando un falso follaje.

**Floración.-** Se Observa un botón verde formando la flor hasta su apertura.

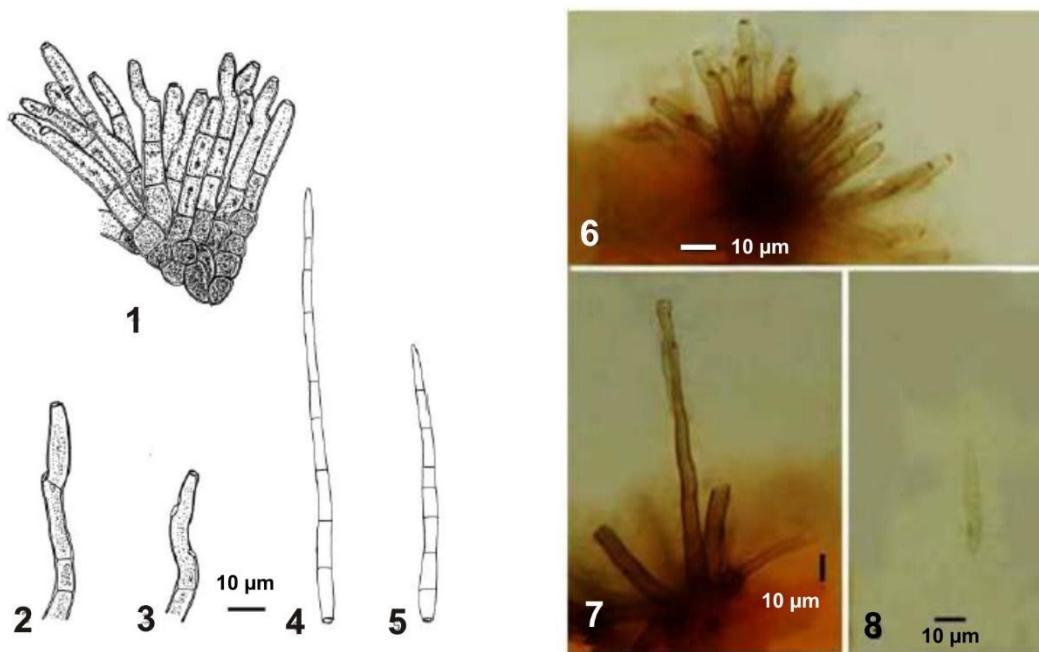
**Fructificación.-** Se aprecia un fruto verde que termina volviéndose rojo.

**Maduración y cosecha.-** Se presentan características como ramas de un color verde intenso, frutos marrones y decaimiento de la planta, que sumado a un retiro de riego y corte total de la planta, da inicio nuevamente a la brotación.

## **2.2 DESCRIPCIÓN DEL PATÓGENO *Cercospora asparagi***

Existen más de 1,200 especies del género *Cercospora* y su nombre viene del griego Kérkos (que al latín se traduce como cerco) que significa cola, gusano, y del griego sporá, que significa semilla, refiriéndose a las estructuras de dispersión. Sus estructuras reproductivas son las fragmosporas (conidias con 3 o más células), que son alargadas, cilíndricas o filiformes, multiseptadas, hialinas y usualmente truncadas en el punto de unión con los poros de los conidióforos, que son geniculados (Ulloa y Herrera, 1994; Castaño, 2005).

La especie *C. asparagi*, presenta estromas desarrollados elipsoidales compuesto de células hifales hinchadas con conidióforos adheridos, fragmosporas (conidias) filiformes y hialinas, que son las estructuras de dispersión (Núñez, 2005; Phengsintham *et al.*, 2013), como muestra la Figura 3.



**Figura 3.** *Cercospora asparagi* 1,6 y 7. Estromas con conidióforos adheridos. 2-3. Conidióforos. 4,5 y 8. Conidias. (Phengsintham *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Clasificación Taxonómica

Se usó para la clasificación el portal de datos del Sistema Nacional de Datos Biológicos de la Argentina, SNDB (s.f.)

Reino Fungi

Filo Ascomycota

Clase Dothideomycetes

Orden Capnodiales

Familia Mycosphaerellaceae

Género *Cercospora*

Especie *Cercospora asparagi* Sacc.

### 2.2.2 Patología

El fitopatógeno se presenta en la parte aérea de la planta (tallos, ramas y filocladios), esta infección produce lesiones o manchas necróticas de formas alargadas, elípticas u ovals de color amarillo pajizo, marrón claro a gris parduzco produciendo rebordes rojizos a marrones oscuros, observándose un halo clorótico siendo esta característica la forma de su identificación. Los filocladios se tornan de color amarillo y los anillos de color marrón, produciendo defoliación temprana y llegando a secar la planta (Limgroup, 2015; Sánchez y Apaza, 2000; Sánchez y Sánchez, 2008).

Su desarrollo óptimo se da bajo condiciones de alta humedad relativa mayores a 94% y con un rango de temperaturas entre 24 a 30°C. Los microclimas formados por el abundante desarrollo del follaje, densidades altas de siembra, fertilización nitrogenada inadecuada y riegos abundantes favorecen la presencia y desarrollo del patógeno; a su vez el riego tecnificado, un distanciamiento mayor entre las hileras y su orientación a la dirección del viento, previenen su ataque (Limgroup, 2015; Sánchez y Sánchez, 2008).

### 2.2.3 Comparación con el género *Stemphyllium*

Es importante la comparación de *Cercospora asparagi* con el género *Stemphyllium* para poder diferenciarlos y realizar una evaluación adecuado en campo; *C. asparagi* produce las manchas más grandes en tallos principales sin la presencia de un halo aceitoso como si lo presenta *Stemphyllium* además este último presenta una coloración púrpura típica de sus manchas; *C. asparagi* presenta una “pelusa” blanco-grisácea en el momento de la esporulación (Limgroup, 2015; Núñez, 2005; Sánchez y Sánchez, 2008).

Como refiere Gonzáles y del Pozo (1999) en el caso de la especie *Stemphyllium vesicarium*, sobre los tallos muertos es posible observar el desarrollo de numerosos peritecios,

estructuras esféricas que contienen gran cantidad de ascas y ascosporas en su interior, en su fase sexuada es conocido como *Pleospora herbarum*; en el caso de *C. asparagi* no se observa un estado sexuado.

El género *Stemphyllium* con sus 2 especies principales atacando el cultivo de espárrago (*S. botryosum* y *S. vesicarium*) presentan la típica mancha ovalada – redondeada, pequeña de 1 a 6 mm de diametro de color canela con márgenes púrpura oscura ligeramente hundida de centro plumizo a marrón claro con un halo de apariencia aceitosa, como describe González y del Pozo (1999), Limgroup (2013), Sánchez y Apaza (2000) y Sánchez y Sánchez (2008); detalles y diferencias con *Cercospora asparagi* se describen en la Tabla 1.


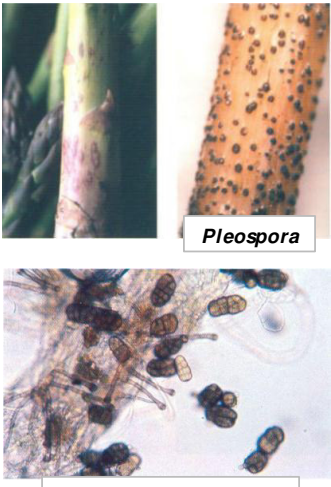

#### **2.2.4 Ciclo de la enfermedad**

Las nuevas infecciones provienen de la diseminación de conidios, producto del viento, maquinarias y personal de campo, que provee un inóculo inicial que llega desde el tejido enfermo de la temporada anterior, debido a que este hongo sobrevive en los restos vegetales por períodos muy prolongados (Figura 4) (González y del Pozo, 1999; Limgroup, 2015; Núñez, 2005 y Sánchez y Sánchez, 2008).

En el campo la infección comienza en los tallos en plena brotación, los cuales se observan manchados en su totalidad; cuando el fitopatógeno presenta una alta severidad, conforme la planta se desarrolla la infección se concentra en el follaje provocando la caída de los filocladios (Sánchez y Sánchez, 2008).



**Tabla 1.** Diferencias entre el *Cercospora asparagi* y especies de *Stemphyllium*. (González y del Pozo, 1999; Sánchez y Apaza, 2000; Núñez, 2005; Sánchez y Sánchez, 2008; Limgroup, 2013 y Phengsintham, *et al.*, 2013).

Agente Causal	<i>Cercospora asparagi</i>	<i>Stemphyllium vesicarium</i>	<i>Stemphyllium botryosum</i>
Nombre de la enfermedad	Tizón Cercosporiosis Mancha por Cercospora	Máncha púrpura Estemfiliosis	Máncha púrpura Estemfiliosis
Sintomatología	Lesiones irregulares, alargadas, de tamaño variable (0.5 a 3 cm). Las lesiones pueden distorsionar el tallo y coalescer para dejar largos sectores del tallo manchado o anillados, lo cual seca el follaje sobre la lesión, dando un aspecto de atizonado. Esto último es confundido normalmente con una senescencia temprana.	Lesiones de 1 - 5 mm de diámetro en los turiones, con bordes púrpuras y centro plumizo y deprimido. Defoliación.	Pequeñas manchas ovaladas de color marrón claramente delimitadas (2-6 mm) en todas las partes del tallo. El centro de la manchita suele ser de color marrón claro. En el estado inicial las manchas aparecen primero en la base de los tallos, cerca del suelo.
Diseminación	Como conidias a través del viento.	Como ascosporas al inicio de la temporada, posteriormente son las conidias del ciclo asexual del hongo.	Las primeras infecciones por ascosporas, generalmente visibles en la base del tallo
Imágenes	 <p>Conidios y Conidióforos</p>	 <p>Pleospora</p> <p>Conidios y Conidióforos</p>	 <p>Pleospora</p>





**Figura 4.** Ciclo de *Cercospora asparagi* (Núñez, 2005).

### 2.2.5 Importancia de la enfermedad

La costa tiene diferentes características que la han vuelto un lugar donde diferentes cultivos se han desarrollado satisfactoriamente durante todo el año, el espárrago es un producto que, gracias a las condiciones climáticas y al adecuado suelo de la costa, se ha convertido en uno de los muchos cultivos de exportación, por ello diversas plagas y enfermedades han encontrado condiciones favorables para el desarrollo de sus poblaciones (Bettioli *et al.*, 2014; Cabrera, 2017).

*Cercospora asparagi* está localizado en los departamentos de Ica, Lima, Ancash, La Libertad y Lambayeque. En las provincias de Chincha y Barranca de los departamentos de Ica y Lima respectivamente, el ataque es severo sobre todo en épocas de invierno, ocasionando daños importantes en tiempos cortos, produciendo en esparragueras muy infectadas un color marrón grisáceo, como si se hubiera retirado el riego o si sufriera un

envejecimiento prematuro; lo que reduce su productividad (González y del Pozo, 1999; Núñez, 2005 y Sánchez y Sánchez, 2008).

### **2.2.6 Incidencia y severidad**

Como definen French y Hebert (1980):

“La intensidad de una enfermedad es el grado de daño que ésta ejerce sobre el campo de un cultivo e incluye dos componentes:

Incidencia o número de unidades de plantas afectadas, expresado como porcentaje del número total.

Severidad, o porción de tejido de las plantas afectadas expresado como porcentaje del área total.”

En general la incidencia y severidad del género *Cercospora* son altos en diferentes cultivos como caña, tabaco, café y espárrago como reportan Núñez (2005); Chavarría (2006), Rengifo *et al.*, (2006) y Julca *et al.* (2008).

## **2.3 DESCRIPCIÓN DEL BIOCONTROLADOR *Trichoderma***

El género *Trichoderma* debe su nombre al griego Thríx, que significa pelo, y dérma, que significa piel o corteza, esto debido al aspecto macroscópico de las colonias en sustrato celulósico, siendo su estado sexual *Hypocrea* Fr., forman conidióforos erectos, solitarios o agregados en racimos floccosos, no verticilados, portadores de fiálides solitarias o en grupos que producen fialósporas de coloración verde en masa o con conidios globosos verdes o hialinos. Es común en el suelo, con alta capacidad antagónica y parásita frente a otros microorganismos como fitopatógenos (Ulloa y Herrera, 1994; Castaño, 2005).

*Trichoderma*, es un género utilizado en la producción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, como controlador biológico de fitopatógenos, biodegradación y biorremediación. Dentro de los principales agentes de control biológico de este género, han sido reportadas las especies *Trichoderma virens*, *T. harzianum* y *T. viride* (anteriormente *Gliocladium virens*), las cuales se encuentran disponibles comercialmente. Una lista parcial de los géneros de hongos patógenos afectados por *Trichoderma* incluye: *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*, *Endothia*, *Fulvia*, *Fusarium*, *Fusicladium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Monilia*, *Nectria*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Venturia*, *Verticillium*, y hongos de la pudrición de la madera (Esposito y da Silva, 1998; Hermosa *et al.*, 2000; Monte y Llovel, 2003).

### 2.3.1 Clasificación taxonómica

Basándose en la clasificación taxonómica de Alexopoulos y Mimm (1985), el género *Trichoderma* se ubicaría de la siguiente manera (Michel, 2001):

Reino Mycetae (Fungi)

División Eumycota

Subdivisión Deuteromycotina

Clase Hyphomycetes

Orden Hyphales (Moniliales)

Familia Moniliaceae

Género *Trichoderma*

Especies *Trichoderma harzianum*

*Trichoderma virens*

*Trichoderma viride*

### **2.3.2 Mecanismos de acción**

En la acción biocontroladora de *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y/o nutrientes, interacciones con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno e indirecta generando o induciendo resistencia de la planta (Blaszczyk *et al.*, 2014; Fernández- Larrea, 2001; Infante *et al.*, 2009; Waghunde, Shelake y Sabalpara, 2016).

#### **2.3.2.1 Competencia**

Es una de las formas de antagonismo, donde el uso de un requerimiento (sustrato, espacio y/o nutrientes) por parte de un organismo, reduce o limita la disponibilidad para otro u otros organismos, esta reducción puede ser una cantidad necesaria o un espacio disponible (Infante *et al.*, 2009; Martínez, Infante y Reyes, 2013; Waghunde *et al.*, 2016).

*Trichoderma* tiene plasticidad ecológica (se encuentra de manera natural en diferentes suelos) sumada a su alta competitividad por espacio y nutrientes (dependiendo de la especie), hace que este adaptado para una colonización agresiva, ya que además forma clamidosporas que son estructuras de supervivencia (Infante *et al.*, 2009).

*Trichoderma* posee alta velocidad de crecimiento, este factor frena a los competidores, colonizando los microambientes y evitando la instalación de otros microorganismos, como puede evidenciarse en pruebas de laboratorio como por ejemplo el cultivo dual, entre *Trichoderma* y *Rhizoctonia solani* (Martínez *et al.*, 2013).

### 2.3.2.2 Micoparasitismo

Este mecanismo se da producto de la interacción con el patógeno, una simbiosis antagónica, donde participan enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, glucanasas y proteasas que tendrán efecto sobre las paredes celulares de los hongos parasitados (Fernández-Larrea, 2001; Infante *et al.*, 2009 y Waghunde *et al.*, 2016).

*Trichoderma* actúa sobre los fitopatógenos mediante enzimas hidrolíticas que son la maquinaria que permite la penetración de sus hifas al hospedante, produciendo vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, en los organismos con los que interactúa (Ezziyyani *et al.*, 2011 y Martínez *et al.*, 2013). Como ejemplo se encontró que las cepas de las diferentes especies de *Trichoderma* presentan actividad micoparasítica sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans* produciendo enrollamiento y penetración de las hifas del antagonista sobre las del fitopatógeno (Michel, 2001).

### 2.3.2.3 Antibiosis

En el control biológico se ha demostrado que uno o más antibióticos suprimen a los patógenos en la rizosfera, así los análisis genéticos, a través del estudio de mutantes lo confirman. Dentro de los mecanismos de control biológico de *Trichoderma* y *Gliocladium*, se encuentra la producción de los antibióticos estructuralmente complejos como la gliovirina y gliotoxina, esto se confirma en el uso de los mutantes de *Gliocladium virens* que no producen gliotoxina, reducen el control de *Pythium* (Handelsman y Stabb, 1996 y Waghunde *et al.*, 2016).

Ejemplos de la acción de estos hongos los podemos encontrar en el trabajo de Lartey *et al.* (2010) quienes reportaron la acción biocontroladora *Laetisaria arvalis*, *T. harzianum*, *T.*

*aureoviride* y *T. virens* frente *Cercospora beticola* en remolacha, indicando que esta acción sería debido a la producción de toxinas.

### **2.3.3 Desarrollo de consorcios compatibles**

Otro enfoque para obtener un consorcio de biocontrol microbiano exitoso es aplicar mezclas de agentes de control biológico que muestren diferentes mecanismos supresores de enfermedades que son complementarios entre sí; De Boer (2003), citado por Kumar, Thakur y Rani (2014), mencionaron que aparte de la manipulación genética de las cepas de biocontrol para mejorar su eficacia, conocer su mecanismo de acción permite combinarlos y así optimizar sus efectos beneficiosos. Como en el caso de *Trichoderma*, donde las mezclas de cepas y las combinaciones con otras bacterias u hongos, a menudo proporcionan un control más eficaz que la aplicación individual.

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESIS

Tres especies de *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens*) presentan acción biocontroladora frente a *Cercospora asparagi* Sacc. en el cultivo de *Asparagus officinalis* L. (Espárrago)

#### 3.2 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la acción biocontroladora de tres especies de *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens*) frente a *Cercospora asparagi* Sacc. en el cultivo de *Asparagus officinalis* L. (espárrago).

#### 3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar al fitopatógeno (*C. asparagi*) macroscópicamente en campo y microscópicamente en laboratorio.
- Evaluar la incidencia y severidad de la enfermedad.
- Comparar el efecto biocontrolador de las 3 especies de *Trichoderma* frente a *C. asparagi* Sacc.
- Evaluar si la incorporación de sustrato influye en el efecto biocontrolador de las 3 especies de *Trichoderma*.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 LUGAR DE ENSAYO

Lo ensayos se realizaron en la Empresa Agrícola Copacabana S.A., ubicada en el distrito de El Carmen, Provincia de Chincha, Departamento de Ica (Figura 5), con coordenadas 13° 30' 40.65" S y 76° 07' 24.47" O y una elevación de 65 m.



**Figura 5.** Mapa de ubicación de la Empresa Agrícola Copacabana (Google maps, s.f., recuperado el 29 de enero del 2019) donde se realizó el ensayo.



## 4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

**4.2.1 Hongos antagonistas:** fueron proporcionados por el área de Antagonistas de la Subdirección de Control Biológico, Servicio Nacional de Sanidad Agraria, en sustrato de arroz, siendo sus respectivos lugares de procedencia:

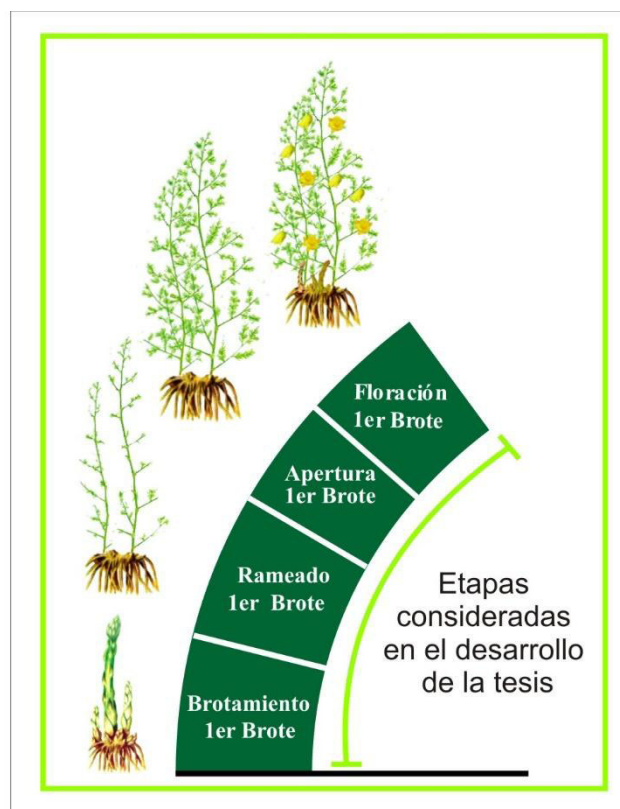
- *Trichoderma harzianum* (Rifai 1969) Cañete, Lima-Perú.
- *Trichoderma viride* (Persoon 1821) Huaral, Lima-Perú.
- *Trichoderma virens* (Miller, Giddens y Foster 1963) Estados Unidos de América.

**4.2.2. Hongo fitopatógeno:** *Cercospora asparagi* se obtuvo a través de la infección de un cultivo de espárrago por tejido afectado en campo.

**4.2.3. Material vegetal:** Se utilizó un área aproximada de 2 500 m<sup>2</sup> de cultivo de espárrago (*Asparagus officinalis*) de la variedad UC 157 F1, al que se realizó un corte de tallo y filocladios dejando las coronas (raíces) para el brotamiento (Figura 6).



**Figura 6.** Vista panorámica del área total del ensayo (Agrícola Copacabana, Chíncha-Ica)



**Figura 7.** Etapas fenológicas de *Asparagus officinalis* L. (Núñez, 2005) consideradas en el desarrollo del ensayo.

Las diferentes actividades del ensayo se realizaron durante 4 etapas del desarrollo fenológico del cultivo del espárrago: Brotamiento, Rameado, Apertura y floración como muestra la Figura 7.

#### **4.3 IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO *Cercospora asparagi* EN EL CULTIVO DE *Asparagus officinalis***

Las muestras de tejido vegetal afectados fueron tomadas asépticamente del lugar de muestreo (de ensayo) y transportadas en una caja de conservación a baja temperatura hacia el laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad Nacional

Mayor de San Marcos, siendo refrigerados a 4 °C para su posterior procesamiento dentro de un período máximo de 18 horas.

#### **4.3.1 Procesamiento de las muestras**

De las plantas colectadas se seleccionaron partes del tejido vegetal del tallo, las mismas que fueron cortadas con la ayuda de una tijera previamente desinfectada, en pequeños trocitos de 1 cm. de diámetro. Posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% durante 1,0 minuto, y luego se lavaron con agua destilada, para eliminar algún residuo de cloro (Calderón, 2004), luego de lo cual, se procedió a realizar la identificación directa del patógeno (Maumary, Lenzi, Sillon y Rista, 2002), raspando el tejido superficial afectado y colocado sobre láminas, con una gota de azul de lactofenol y se cubrió con una laminilla, presionando para distender el tejido afectado; se observó al microscopio óptico de campo luminoso (Pons, 2007), donde se realizó el reconocimiento morfológico. La clave utilizada fue la de MORE DEMATIACEOUS HYPHOMYCETES del autor Ellis, M. (1976) (Anexo 1).

#### **4.3.2 Determinación de la Incidencia y Severidad**

Se evaluaron los brotes y tallos para identificar el daño característico (manchas necróticas) a través de un conteo por visualización directa. El porcentaje de la incidencia se determinó con la fórmula de French y Hebert (1980):

$$I: \frac{TaMn \times 100}{TTa}$$

Donde:

I: Incidencia.

TaMn: tallos con manchas necróticas.

TTa: total de tallos (con manchas necróticas + sanos).

Se evaluó el porcentaje de severidad entendiéndose como el daño producido por las manchas necróticas. Para ello se adaptó la escala de evaluación de Sánchez y Apaza (2000) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Escala de Evaluación de *C. asparagi* adaptado de Sánchez y Apaza (2000).

Grado	% Tejido enfermo	Descripción
0	0	Brote sano.
1	0-3	Brote con 1 a 6 manchas.
2	3-8	Brote con 7 a 18 manchas.
3	8-15	Más de 18 manchas en cada brote, pero no se observa secado ni defoliación.
4	15-25	Inicio de defoliación en el tercio inferior y/o brotes con un 15 a 25% de manchas.
5	25-50	Defoliación y secado de tallos. Más de 1/4 de brote con secado y defoliación.
6	>50	La mitad de la planta seca hasta muerte total del brote.

#### 4.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA EN CAMPO DE TRES ESPECIES DE *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens*)

##### 4.4.1 Propagación de los hongos antagonistas

La Metodología de producción del hongo antagonista (Anexo 2), fue la usada por la unidad de Antagonistas de la Subdirección de Control Biológico, Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), la cual ha sido actualizada en el manual de producción y uso de hongos antagonistas (Gómez *et al.*, 2013); consistió en retirar el micelio de la superficie de una placa purificada procedente de la activación del hongo antagonista, con una solución de 2 gotas de Tween 80 en un litro de agua destilada. Se agregó una cantidad suficiente de la solución (10 ml aproximadamente) para arrastrar al cultivo del hongo, con ayuda de una espátula estéril, se agregó la suspensión resultado en un frasco que contenía 650 ml con medio de cultivo melaza de caña / levadura de cerveza / cloramfenicol. Se agito esta solución a 120 rpm por 3 días, observándose el crecimiento micelial en el medio líquido.

Este cultivo líquido sirvió para aproximadamente 20 kilos de arroz (aprox. 30 ml por Kilogramo), se mezcló bien el inóculo y se incubó por 7 días, abriendo al tercer día un lado de la bolsa para su oxigenación adecuada. Las temperaturas de incubación fueron:

- *Trichoderma harzianum* de 25 a 30°C.
- *Trichoderma viride* de 25 a 26°C.
- *Trichoderma virens* de 25 a 26°C.

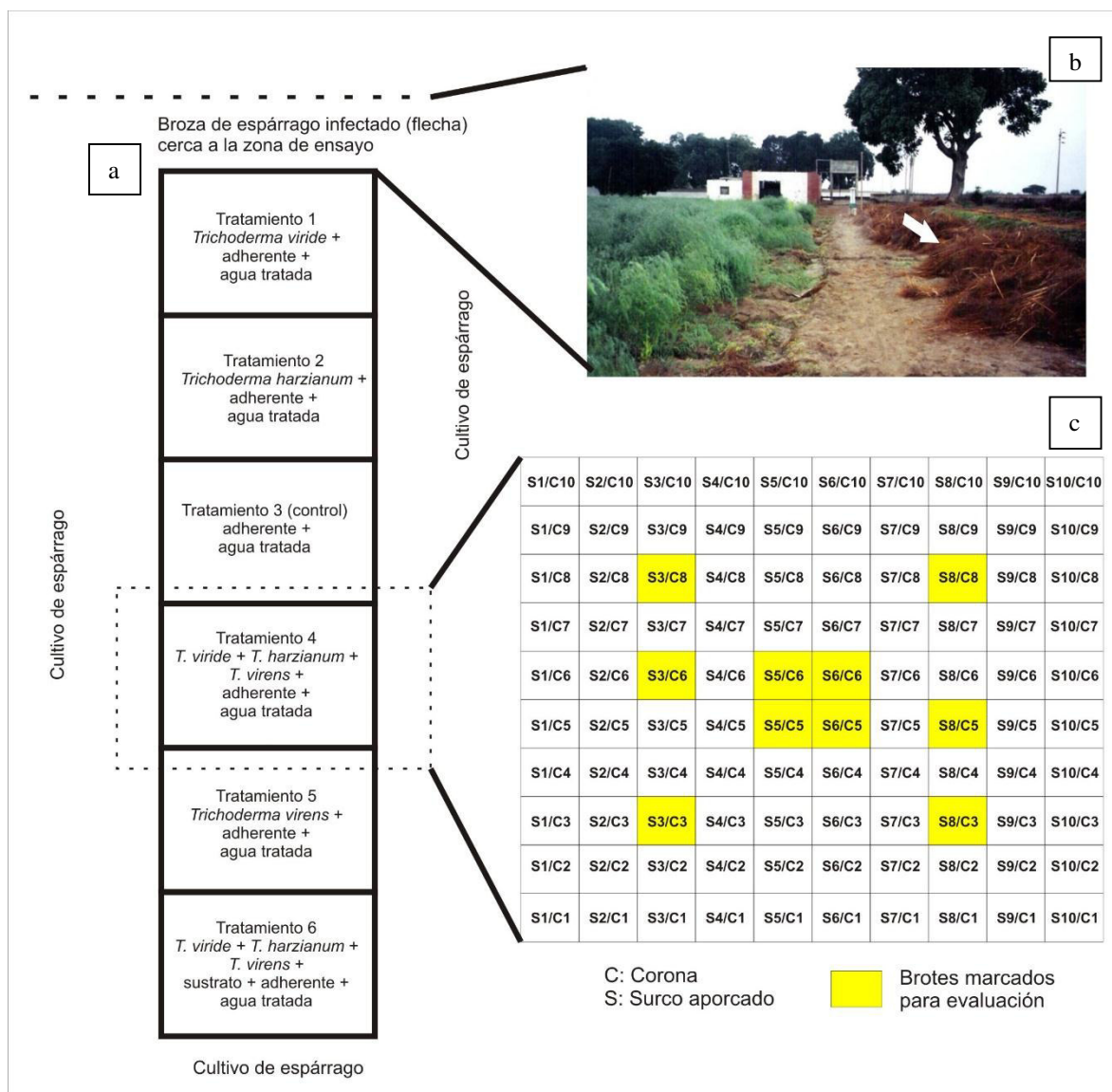
Se observó en el centro de las bolsas con arroz, un color verdoso homogéneo, característico de un esporulado adecuado. La identificación de los hongos antagonistas se realizó con la clave del libro *Trichoderma y Gliocladium* Vol. 1, Basic Biology, Taxonomy and Genetics de los autores Kubicek y Harman (1998) (Anexo 3a, 3b y 3c).

#### **4.4.2 Ensayo de aplicación en campo**

La metodología se adaptó de Leandro y Soto (1980), diseño de un bloque al azar con 6 tratamientos, evaluando 10 brotes por tratamiento, procediéndose a delimitar el área total con banderillas confeccionadas de plásticos y carrizos (Anexo 6), cada tratamiento tuvo un largo de 10 coronas o matas con un ancho de 10 surcos (líneas sembradas) (Figura 8 y Figura 9a).

Los tratamientos fueron 6:

1. *Trichoderma viride* + adherente (aceite agrícola) + agua tratada.
2. *Trichoderma harzianum* + adherente (aceite agrícola) + agua tratada.
3. *Trichoderma virens* + adherente (aceite agrícola) + agua tratada.
4. Control: adherente (aceite agrícola) + agua tratada.
5. Las 3 especies de *Trichoderma* + adherente (aceite agrícola) + agua tratada.
6. Las 3 especies de *Trichoderma* + adherente (aceite agrícola) + agua tratada + sustrato.



**Figura 8.** Distribución de los tratamientos en el ensayo, a) Orden de los tratamientos en campo con la descripción de cada tratamiento. b) Borde con broza infestada al lado del camino: alrededor de todo el ensayo existía una plantación con síntomas iniciales de la enfermedad como muestra también en la Figura 6. c) Características de cada tratamiento: los cuadrados representan la posición de cada corona en el surco aporcado (Anexo 7), en los cuadros amarillos se marcó un brote para su evaluación.





**Figura 9.** Delimitación de los tratamientos (a) y marcado de los brotes de la corona en los tratamientos (b).

En cada tratamiento los 10 brotes fueron marcados para su evaluación con una ficha de cartón amarrada a la base del brote por un pedazo de rafia (Figura 9b). Se procedió al acondicionamiento del agua para las atomizaciones, en un cilindro de 200 L de capacidad, para ello previamente se midieron la dureza y el pH, con el Kit de dureza Total AQUAMERCK™ y la cinta de pH respectivamente (Anexo 4), corrigiendo el pH con Alkylaryl poly ethoxy etanol al 14%, esta metodología se adaptó de la aplicación de hongos entomopatógenos de Gómez (2004).

La dosis para las aplicaciones fue de 4 Bolsas (800 gr. cada bolsa) de hongo /cilindro de 200 L y aceite agrícola como adherente a razón de 200 ml/cilindro.

Se agregó 25 ml de aceite agrícola por bolsa de los hongos antagonistas con 100 ml de agua tratada, amasando esta mezcla para desprender las esporas del arroz, agregando todo en un balde a medio llenar de 20 L de capacidad para separar el arroz, a través de

una malla y solo incorporar la emulsión de esporas al envase final de donde será atomizado (Anexo 5) (Gómez, 2004).

En el caso de la mezcla de hongos se agregó por cilindro 1.07 Kg de cada especie, este valor lo obtenemos de sumar el peso de cuatro bolsas (800 gr x 4=3200 gr), entre 3 que son las especies de *Trichoderma* (3200 gr/ 3 = 1.07 gr). La aplicación se realizó con una atomizadora marca SOLO de 12 L de capacidad, que permitió formar gotas menores a 150 µm, que son las recomendadas (FAO, 2001) y de 50 a 70 gotas/cm<sup>2</sup> y alta uniformidad (Massaro, 2004), la aplicación en un primer momento fue sobre los brotes y suelo, dirigiéndolo posteriormente sobre los filocladios cuando estos se desarrollaron, 500 ml por planta o mata de la solución de cada hongo, las aplicaciones se realizaron en las tardes (4 pm aprox.), recomendado por Gómez (2004).

Se realizaron 2 aplicaciones, la primera aplicación se realizó una vez terminado el corte del follaje o chapodo, al inicio del brotamiento, por lo que la primera atomización fue dirigida al suelo sobre las coronas y algunos brotes iniciales y luego la siguiente aplicación, 15 días después.

#### **4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA EN CONJUNTO DE TRES ESPECIES DE *Trichoderma*, INCORPORANDO UNA MEZCLA DE PAJILLA DE MAÍZ**

En el tratamiento 6, el arroz resultante de la extracción de esporas de los tratamientos anteriores se mezcló con pajilla de maíz en una proporción 1/7 respectivamente (Figura 10a), al cual se le agregó 250 ml de ácido acético al 5% por cada 5 Kg de la mezcla para dejarla al medio ambiente por una semana (Figura 10b), fue aireada volteando la mezcla



cada 2 días, este método fue adaptada de la fermentación en sólido de Abdo (1999), para posteriormente incorporar esta mezcla a cuello de planta y sobre los brotes, esto se realizó con la primera atomización, el resto de sustratos de la siguiente atomización fue incorporado directamente sobre el tratamiento 6 (Figura 10c).

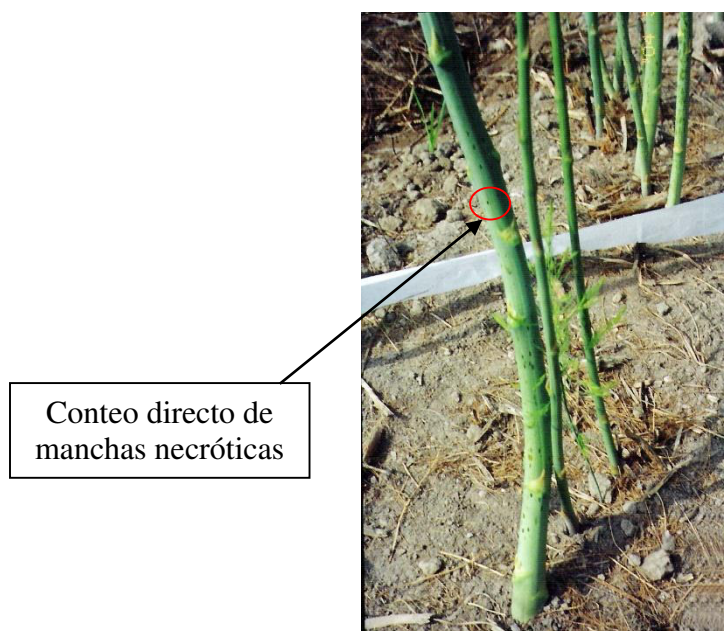


**Figura 10.** Mezcla (a), fermentación (b) e incorporación del sustrato con hongos (c).

#### 4.6 METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

Las evaluaciones se realizaron contando las manchas necróticas directamente sobre los tallos y filocladios marcados de cada tratamiento (Sánchez y Apaza, 2000) (Figura 11), con una evaluación 2 días después del inicio de la brotación, para evitar la confusión con especies de *Stemphyllium* que se presenta en el brote principalmente y que la mancha necrótica de *C. asparagi* este definida para su identificación; la segunda evaluación a los

15 días aproximadamente de la primera evaluación, para observar el desarrollo del patógeno, y la tercera evaluación a la semana de la segunda evaluación.



**Figura 11.** Manchas necróticas de *C. asparagi*.

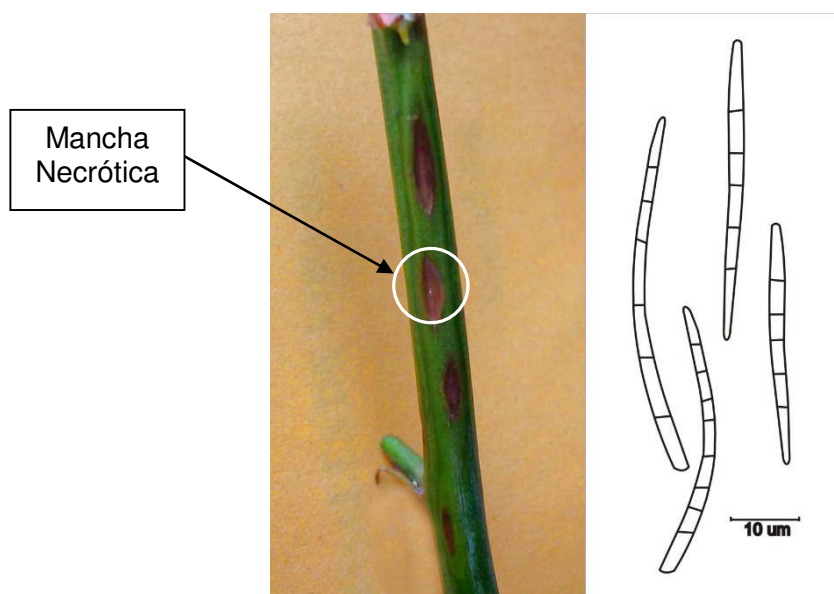
#### **4.7 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos fueron analizados y/o procesados mediante el software estadístico SPSS V.20, primero se realizó la prueba Kolmogorov – Smirnov donde se determinó que los datos no seguían una distribución normal, por lo que la significancia estadística ( $p < 0.05$ ) fue obtenida mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

## V. RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO *Cercospora asparagi*

Se logró identificar a la especie *C. asparagi* como causante de la formación de manchas necróticas, a través de la caracterización de sus estructuras reproductivas desde el punto de vista macro y microscópico, para ello en las muestras procesadas de *A. officinalis* se observó el tejido afectado (Figura 12a) y al microscopio se apreció las conidias hialinas típicas de 4-5 u y conidióforos fasciculados (Figura 12b).



**Figura 12.** *Cercospora asparagi*, a. Manchas necróticas, mostrando la forma y coloración característica, en un tallo de espárrago, b. Dibujos de conidias de *C. asparagi*, observando su forma filiforme y multiseptadas.

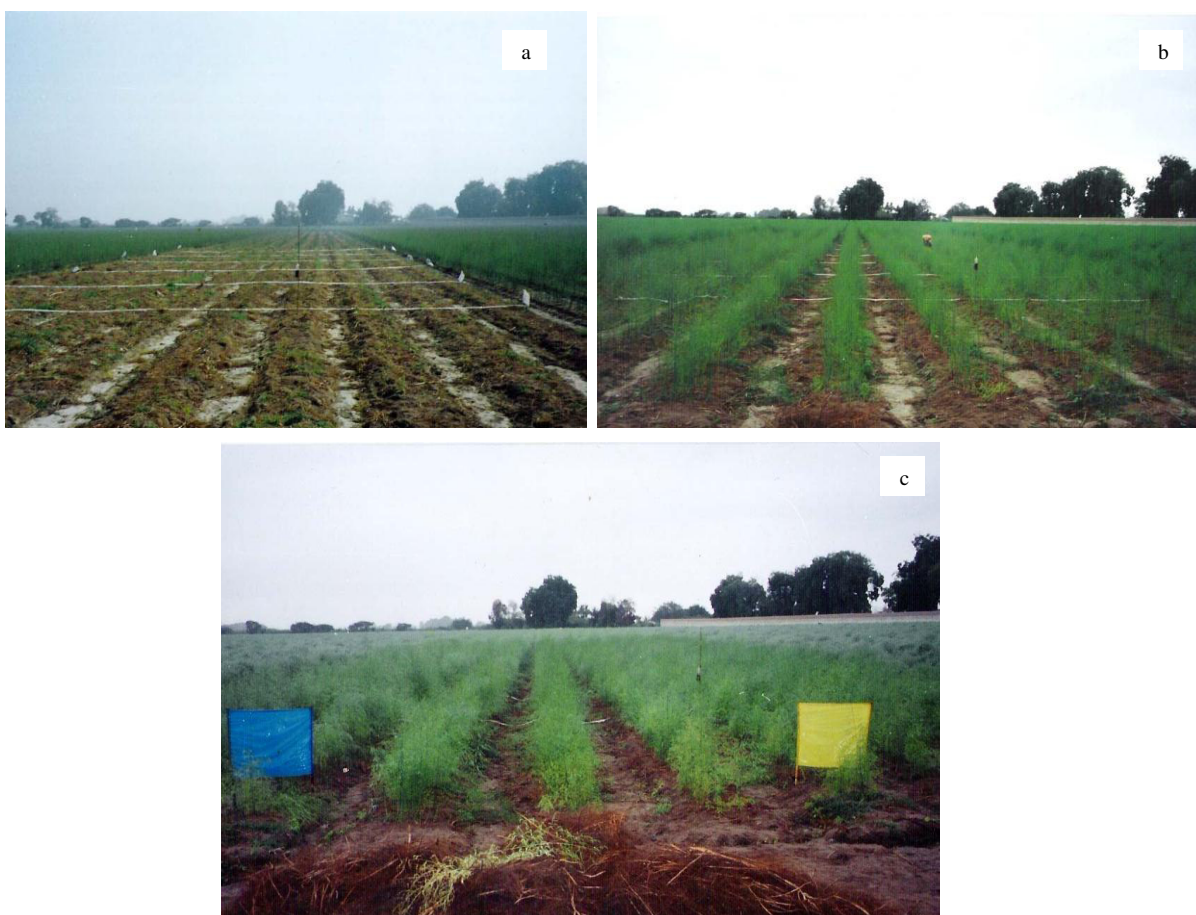
### 5.2 EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE *Cercospora asparagi*.

Las fechas de las evaluaciones en el área del ensayo, se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Fechas de las evaluaciones realizadas.

	Mayo	Junio	
Evaluación	29	15	22

El mayor desarrollo del ensayo ocurrió en el mes de junio, la primera evaluación se realizó 2 días después de la atomización de las especies de *Trichoderma*, debido a que los brotes de espárrago no se encontraban emergidos. Todas las medidas se evaluaron hasta la etapa fenológica de floración del 1er brote, como muestra la Figura 13, terminando la investigación antes que las manchas necróticas se elevaran, produciendo daño económico.



**Figura 13.** Desarrollo del cultivo durante el ensayo, a: Inicio, b: 2 semanas y c:3 semanas.

Para la determinación de la incidencia y severidad se realizó el conteo del número de manchas necróticas para cada tratamiento (Tabla 4).

**Tabla 4.** Número de Manchas Necróticas por tallo, sus promedios y medias en los 6 Tratamientos (T1: *T. viride*, T2: *T. harzianum*, T3: Control, T4: 3 especies de *Trichoderma*, T5: *T. virens* y T6: 3 especies de *Trichoderma* más sustrato).

Trat 1 ( <i>T. viride</i> )	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)	Trat 4 ( <i>T. viride</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>T. virens</i> )	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)
1	2	26	53	1	13	50	42
2	3	16	40	2	0	16	127
3	25	157	196	3	9	153	127
4	46	161	182	4	9	86	186
5	0	33	95	5	0	34	77
6	2	37	140	6	5	104	215
7	0	16	30	7	22	158	247
8	0	1	10	8	0	125	253
9	0	46	106	9	4	182	275
10	7	99	146	10	18	147	227
Promedio	8,5	59,2	99,8	Promedio	8	105,5	177,6
Mediana	2	35	100,5	Mediana	7	114,5	200,5
Trat 2 ( <i>T. harzianum</i> )	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)	Trat 5 ( <i>T. virens</i> )	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)
1	7	60	90	1	0	23	59
2	8	107	196	2	3	177	278
3	6	102	171	3	0	45	115
4	12	61	110	4	16	165	217
5	28	134	279	5	3	110	187
6	3	42	76	6	15	128	420
7	9	78	112	7	0	7	49
8	15	166	232	8	0	6	22
9	2	82	163	9	15	102	172
10	22	90	95	10	11	85	187
Promedio	11,2	92,2	152,4	Promedio	6,3	84,8	170,6
Mediana	8,5	86	137,5	Mediana	3	93,5	179,5
Trat 3 (Control)	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)	Trat 6 ( <i>T. viride</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>T. virens</i> + sustrato)	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)
1	12	103	146	1	10	72	80
2	14	150	193	2	4	65	92
3	5	98	110	3	2	58	63
4	2	110	120	4	9	62	72
5	0	99	199	5	8	108	130
6	1	8	17	6	1	45	66
7	4	150	223	7	0	11	48
8	36	234	267	8	7	49	78
9	0	24	40	9	3	13	69
10	9	89	113	10	4	6	53
Promedio	8,3	106,5	142,8	Promedio	4,8	48,9	75,1
Mediana	4,5	101	133	Mediana	4	53,5	70,5

Trat: Tratamiento, Mn: Número de Manchas necróticas y Ev: Evaluación.

La incidencia y severidad se obtuvo del promedio del número de manchas necróticas de la Tabla 4, obteniendo la Tabla 5 y 6, en función de la fórmula de French y Hebert (1980) y la escala de evaluación de Sánchez y Apaza (2000) (Tabla 2), respectivamente.

**Tabla 5.** Incidencia de la enfermedad para la primera evaluación (a 2 días de la atomización de las especies de *Trichoderma*), para cada tratamiento y para el recuento total de tallos.

Tratamientos	Trat 1 ( <i>T. viride</i> )	Trat 2 ( <i>T. harzianum</i> )	Trat 3 (Control)	Trat 4 ( <i>T. viride</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>T. virens</i> )	Trat 5 ( <i>T. virens</i> )	Trat 6 ( <i>T. viride</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>T. virens</i> + sustrato)	Totales
Nº Tallos evaluados	Tallos (1º Evaluación)						60
Tallos Sanos	4	0	2	3	4	1	14
Tallos Afectados	6	10	8	7	6	9	46
Incidencia	60	100	80	70	60	90	76,66666667

Trat: Tratamiento

Se observó que la incidencia de cada tratamiento fue superior al 60 % (Tabla 5). De la Tabla 4, se observa en la primera evaluación que todos los tratamientos iniciaron con presencia de manchas necróticas y en la escala de Sánchez y Apaza (2000) presentaron el grado 2 (Tabla 6).

La severidad para la tercera evaluación de *T. viride* y el consorcio más el sustrato fue de grado 3, presentando el resto de tratamientos una severidad de grado 4.



**Tabla 6.** Severidad de la enfermedad en grados para el promedio de manchas necróticas de las evaluaciones.

Trat 1 ( <i>T. viride</i> )	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)	Trat 4 ( <i>T. viride</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>T. virens</i> )	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)
Promedio	8,5	59,2	99,8	Promedio	8	105,5	177,6
Severidad	2	3	3	Severidad	2	3	4
Trat 2 ( <i>T. harzianum</i> )	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)	Trat 5 ( <i>T. virens</i> )	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)
Promedio	11,2	92,2	152,4	Promedio	6,3	84,8	170,6
Severidad	2	3	4	Severidad	2	3	4
Trat 3 (Control)	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)	Trat 6 ( <i>T. viride</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>T. virens</i> + sustrato)	Mn (1° Ev)	Mn (2° Ev)	Mn (3° Ev)
Promedio	8,3	106,5	142,8	Promedio	4,8	48,9	75,1
Severidad	2	3	4	Severidad	2	3	3

Trat: Tratamiento, Mn: Manchas necróticas y Ev: Evaluación.

### 5.3 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS TRES ESPECIES DE *Trichoderma* POR SEPARADO FRENTE AL CONTROL

Las fechas de las atomizaciones realizadas y de las evaluaciones se describen en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Fechas de evaluación y atomización de las tres especies de *Trichoderma*.

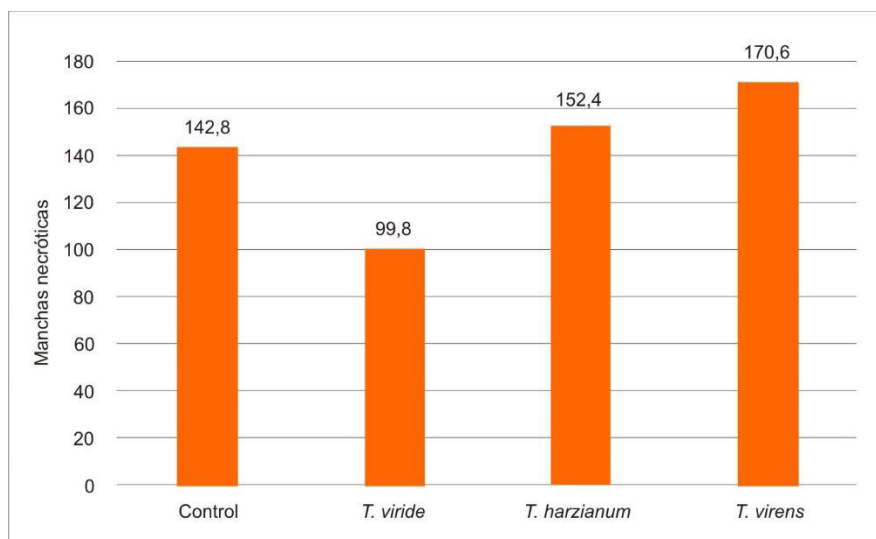
	Mayo	Junio	
Evaluación	29	15	22
Atomización	27	16	

Se midió el pH y la dureza del agua para las aplicaciones, estos valores son considerados adecuados según Gómez *et al.*, 2013. (Tabla 8).

**Tabla 8.** Valores de Dureza y pH del agua usada para las aplicaciones.

	Fechas de Atomización	
	27 Mayo	16 Junio
Dureza	125	130
pH	7	6,5

El promedio del número de manchas necróticas para los tratamientos con *T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens* se muestran en la Figura 14, El tratamiento que presentó un número menor de manchas fue el de *T. viride*.



**Figura 14.** Diferencias en el promedio de número de manchas necróticas entre los tratamientos: Control, *T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens*, puede observarse el promedio menor para el tratamiento con *T. viride* con respecto a los demás tratamientos.

El número de manchas necróticas obtenidas para los tratamientos con *T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens*, para la última evaluación (Tabla 4), no presentaron diferencias significativas respecto al control, como muestra la Tabla 9.

**Tabla 9.** Significancia mediante el test de Kruskal Wallis entre el control (3) y los tratamientos 1,2 y 5 (*T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens* respectivamente) para la tercera evaluación.

	Tratamientos	Significancia
Control	<i>T. viride</i>	0,173
	<i>T. harzianum</i>	0,97
	<i>T. virens</i>	0,705



#### 5.4 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS TRES ESPECIES DE *Trichoderma* EN CONJUNTO Y CON SUSTRATO FRENTE AL CONTROL

Las fechas de las actividades se muestran en la Tabla 10.

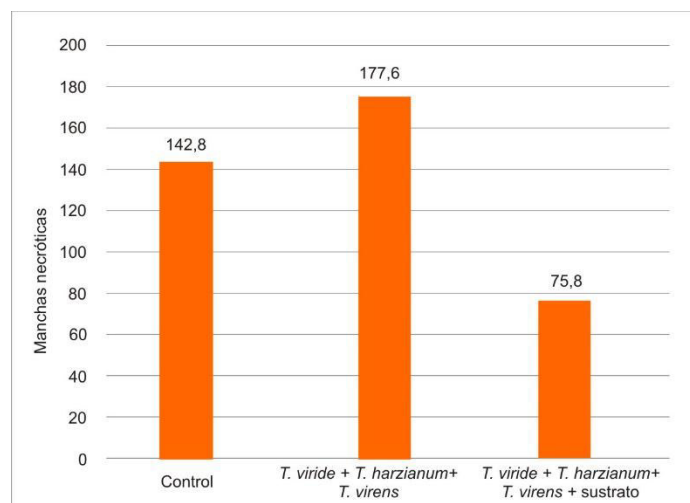
**Tabla 10.** Fechas de las actividades en los tratamientos con los consorcios y el sustrato.

	Mayo	Junio		
Evaluación	29		15	22
Atomización	27		16	
Incorporación del sustrato Tratamiento 6		7	16	

En el análisis estadístico del número de manchas necróticas de la Tabla 4, entre el control con los tratamientos 4 y 6 (consorcio y consorcio más sustrato respectivamente), para la última evaluación, se observa que existe diferencia significativa ( $p=0.041$ ) entre el tratamiento 6 y el control, como muestra la Tabla 11, asimismo en la Figura 15 se observa las diferencias en el promedio de manchas necróticas.

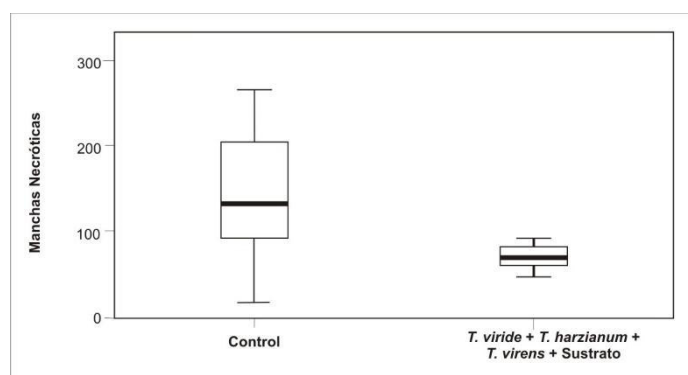
**Tabla 11.** Significancia mediante el test de Kruskal Wallis entre el control (tratamiento 3), el consorcio de 3 especies de *Trichoderma* (tratamiento 4) y el mismo consorcio más sustrato (tratamiento 6) para la tercera evaluación.

	Tratamientos	Significancia
Control	<i>T. viride</i> , <i>T. harzianum</i> y <i>T. virens</i>	0,257
	<i>T. viride</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. virens</i> y sustrato	0,041



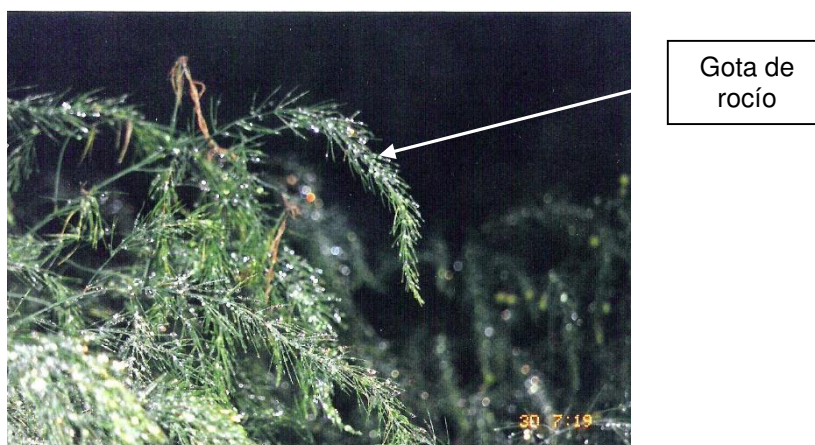
**Figura 15.** Diferencias en el promedio de número de manchas necróticas entre los tratamientos: Control, *T. viride* + *T. harzianum* + *T. virens* y *T. viride* + *T. harzianum* + *T. virens* + sustrato, puede observarse el promedio menor para el tratamiento con sustrato.

Además, en el test de muestras independientes entre el control (tratamiento 3) y el consorcio más el sustrato (tratamiento 6) se puede observar como es la distribución de datos, existiendo una marcada diferencia en el acumulado del total de manchas necróticas del consorcio más el sustrato, que equipara al 25% de datos acumulados del control como se puede observar en la Figura 16.



**Figura 16.** Diagrama de caja para muestras independientes entre el control y el consorcio más el sustrato, donde puede observarse la diferencia de los datos acumulados.

Las condiciones climáticas para el desarrollo de *C. asparagi* en el departamento de Ica para junio fueron garantizados ya que las temperaturas fueron: T. mínima: 11,6°C y T. máxima: 23,2°C con continuas lloviznas que acumularon 4.4 mm (4,4 L/m<sup>2</sup>), siendo su normal 1,3 mm (Figura 16) (SENAMHI 2004).



**Figura 17.** Condiciones Ambientales (gotas de rocío), en el mes de junio ocurrieron continuas lloviznas acumulando 4.4 L/m<sup>2</sup>.

## VI. DISCUSIÓN

A partir de los hallazgos encontrados, aceptamos la hipótesis de que existe una acción biocontroladora por parte del consorcio formado por *Trichoderma viride*, *T. harzianum* y *T. virens*, más un sustrato incorporado, frente a *Cercospora asparagi* Sacc. en el cultivo de *Asparagus officinalis* L. (espárrago).

En nuestro país no existen investigaciones del uso del género *Trichoderma* como biocontrolador sobre *Cercospora asparagi* en el cultivo de espárrago en campo, a pesar de que es un género que reúne numerosas especies, y se han probado sobre otras especies del género *Cercospora* (Acuña, 2006; Larthey *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2017). Este género se encuentra ampliamente distribuido en suelos agrícolas, es utilizado en grandes cantidades en la agricultura para el aumento del rendimiento y en el control que ejercen sobre patógenos de suelo, como lo mencionan Stefanova (2007) y Bokhari y Perveen (2012).

Acuña (2006) investigo la acción *in vitro* e *in vivo* de cepas nativas de *Trichoderma harzianum*, *T. parcenamosum* y *T. virens*, para el control de *Stemphylium vesicarium* una enfermedad foliar, patogénicamente muy parecida a *C. asparagi* en el cultivo de espárrago y Larthey *et al.* (2010) utilizó *in vitro* sobre *Cercospora beticola*, patógeno del cultivo de remolacha, *Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *T. aureoviride*, para su biocontrol; encontrando ambos autores efectos positivos; por lo que estos microorganismos tienen alta potencialidad en el manejo de enfermedades.

En relación al fitopatógeno (*C. asparagi*) se identificó macroscópicamente en campo y microscópicamente en laboratorio. Macroscópicamente en el tejido afectado en campo y en las muestras evaluadas se pudo observar manchas alargadas de forma elípticas de tamaño variable (0.4 a 2 cm), un reborde grueso de color rojizo a marrón oscuro con un centro café, estas son características típicas de *Cercospora asparagi* como mencionan González y del Pozo (1999), Núñez (2005), Sánchez y Apaza (2000) y Sánchez y Sánchez (2008) (Tabla 1).

Microscópicamente se observan conidióforos fasciculados de color marrón oliváceo, de conidias hialinas septadas como describe Ellis (1976), muy distintas de conidióforos y conidias del género *Stemphylium* que son oblongas u ovals con 1-7 septas transversales y 1-2 series completas o casi completas de septas longitudinales como describe Acuña (2006), y Gonzáles y del Pozo (1999) (Tabla 1).

La incidencia y severidad de *C. asparagi* fueron altos en el cultivo de espárrago como puede observarse en la Tabla 5 y 6 respectivamente, estos resultados guardan relación no solo con las condiciones medioambientales como refiere el Boletín meteorológico e Hidrológico del Perú, SENAMHI (2004), sino también por un inóculo constante que representaban las plantas adyacentes (Figura 6 y 8). La incidencia para la primera evaluación (a 2 días de iniciado el ensayo) fue de 76,67 %, para el promedio total de todos los tallos evaluados. El tratamiento 1 con *T. viride* en la última evaluación tuvo un grado de severidad de 3 que representa entre 8-15% de daño y de igual forma en el tratamiento 6 con *T. viride* + *T. harzianum* + *T. virens* + sustrato; en el resto de tratamientos la severidad fue de grado 4 que representa un daño de entre 15-25%, esto indica que en los tratamientos 1 y 6 la enfermedad afectó menos que en los otros tratamientos. Esto reafirma porque es considerada una enfermedad principal, los daños producidos por *C. asparagi* son

importantes en el cultivo de espárrago, afectando el tejido (secándolo) en cortos periodos y evitando una fotosíntesis adecuada (Calderón, 2004; Limgroup, 2015; Núñez, 2005; Sánchez y Apaza, 2000 y Sánchez y Sánchez, 2008). El género *Cercospora* afecta a varios cultivos como el tabaco, como menciona Julca *et al.* (2008) donde por ejemplo la especie *Cercospora nicotianae* tiene gran importancia económica, siendo su severidad y la incidencia tienen una relación directa, observandose además que la enfermedad tiene mayor severidad en épocas lluviosas, coincidiendo con nuestros resultados; Chavarría (2006) informa además que *Cercospora longipes* en caña de azúcar muestra una distribución generalizada y uniforme, en plantas individuales y en la población del cultivo en campo, y para complementar lo dicho en la zona cafetera colombiana, la mancha de hierro, enfermedad causada por el hongo *Cercospora coffeicola* Berk. y Cooke, ataca hojas y frutos del cafeto presentando alta incidencia y severidad, pudiendo causar en almácigo defoliación de hasta el 90% y un 30% de pérdidas en cosecha en plantas expuestas al sol (Rengifo *et al.*, 2006).

Se han reportado numerosos trabajos en condiciones controladas en donde especies de *Trichoderma* son importantes en el manejo de diferentes patógenos como mencionan Mukherjee y Mukhopadhyay (1995); Singh y Maheshwari (2001), citados por Kumar *et al.* (2014), encontrando que *T. harzianum*, *T. virens* y *T. viride* eran protectores eficaces de semillas contra tizón del trigo, *Pythium* spp. y *R. solani*; a su vez Acuña (2006) refiere en términos absolutos que las 3 especies de *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. parcenamosum* y *T. virens*, obtuvieron buenos resultados *in vitro*, siendo su porcentaje de inhibición para *Stemphyllium vesicarium* (patógeno muy similar a *C. asparagi* en espárrago) de 55%, 61% y 62.5% respectivamente, estos resultados en laboratorio no concuerdan con lo obtenido en campo, ya que las tres especies utilizadas individualmente no presentaron diferencias significativas con respecto al control, esto debido a que las concentraciones utilizadas

podieron ser insuficientes para instalar el biocontrolador en el ambiente, u otros factores que influyeron en el control; e aquí donde radica la importancia de realizar ensayos en campo, apoyados en pruebas en condiciones controladas como son la mayoría de los trabajos; se pudo observar que *Trichoderma viride* tiene entre las 3 especies un mejor comportamiento en el promedio de presencia de manchas necróticas (99.8 manchas necróticas en promedio frente a 142.8 del control) para la última evaluación (Figura 14) y en la reducción de la severidad, algo similar pero con una acción controladora positiva obtuvo Ibarra (2015), quién realizó la caracterización de la actividad antagónica de cuatro aislamientos de *Trichoderma* (*T. viride* 1, *T. viride* 2, *T. virens* y *T. harzianum*) contra cinco patógenos del maíz (*Phytium*, *Gibberella moniliformis*, *Fusarium oxysporum*, *F. subglutinas* y *F. verticillioides*) y encontró que la confrontación de *Trichoderma* mostró inhibición hacia *Fusarium* por posible antibiosis. Todas las cepas de *Trichoderma* produjeron indoles, pero *T. viride* 2 produjo mayor cantidad, con 55.0 ug/mL<sup>-1</sup> también Dubey, Suresh y Singh. (2007), encontró que especies de *Trichoderma* evaluados frente al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en cultivo dual y mediante la producción de compuestos volátiles y no volátiles, inhibieron el crecimiento micelial máximo del patógeno encontrando un mayor efecto por parte de *T. viride* seguido de *T. harzianum*, de igual forma Mahajan, Kumar y Dhage, (2018) afirman que *T. viride* es el agente mas prometedor para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *T. viride*, es una especie con ciertas características que pueden darle algunas ventajas como refiere Singh *et al.* (2013), citado por Kumar *et al.* (2014), quién encuentra que la aplicación a semillas de linaza y foliarmente a la planta reduce al patógeno *Alternaria* bajo condiciones de campo.

También se menciona el ensayo sobre *Sclerotium rolfsii* que es un patógeno de muchos cultivos de importancia económica, donde se utilizó compost, aserrín y biocontroladores como *Bacillus*, *Gliocladium roseum*, *Streptomyces rimosus* y *Trichoderma viride* como

alternativas de control químico, estos biocontroladores fueron sembrados simultáneamente en los medios papa dextrosa agar y avena agar, incubados a 30 °C observándose zonas de inhibición y desintegración de *Sclerotium rolfsii*, observando que *Trichoderma viride* ejerció mayor biocontrol que el resto de los microorganismos, caracterizándose por su fácil cultivo in vitro, alta densidad reproductiva, por parasitar internamente micelio y esclerotes mediante estaquillas o clavijas de las hifas que matan al patógeno (Bettiol *et al.*, 2014).

Aportando a todo lo anterior Torres, Iannaccone y Gómez (2008), evaluaron el comportamiento de especies de *Trichoderma in vitro* frente a *Cladosporium fulvum* patógeno de tomate, a 28 °C a las 120 h y 168 h los resultados no mostraron significancia estadística entre las tres especies de *Trichoderma*, a 24 °C y 72 h, el crecimiento de *T. harzianum* fue mejor y a 28 °C fue similar a *T. viride*. a 24 °C y a las 120 h, *T. virens* fue diferente de todas las especies evaluadas, lo que indicaría que existen diferentes factores, como tiempo de crecimiento y temperatura, en el biocontrol *in vitro* del fitopatógeno y comportamientos distintos entre las especies a estas variables.

Las condiciones de campo distan mucho de las condiciones controladas debido a los diferentes factores que intervienen en los estudios realizados, tanto ambientales como propios del microorganismo, en el caso del género *Trichoderma* utiliza diferentes mecanismos de biocontrol, por ello es muy importante explorar los efectos sinérgicos expresados por diferentes genotipos para su uso práctico en la agricultura (Hermosa *et al.*, 2000).

Acuña (2006) en inoculaciones de turiones con *Stemphylium vesicarium* (patógeno similar a *C. asparagi*) obtuvo un porcentaje de incidencia para el Testigo, *T. harzianum*, *T. parcenamosum*, *T. virens* y mezcla de las 3 especies de *Trichoderma*, 78%, 36%, 31% y



30% y 25%, respectivamente, no concordando con nuestros resultados, ya que en los tratamientos donde se utilizó las tres especies en conjunto no se observó diferencia significativa con el control, con respecto a la presencia de manchas necróticas, como ya se mencionó anteriormente posiblemente debido a las concentraciones del biocontrolador y número de aplicaciones; otros autores coinciden con Acuña (2006) recalcando que la formación de consorcio ha sido importante en el control del fitopatógeno como menciona Kumar (2013) y Raguhchander *et al.* (2011), citados por Kumar *et al.* (2014), refieren que el cóctel de varias cepas de *Trichoderma* proporcionó una protección mejorada que el organismo de forma individual, a su vez Rehman *et al.* (2013), encontró que el efecto combinado de ambos antagonistas (*T. viride* + *T. harzianum*) era más eficaz (87,33%) en la inhibición del crecimiento de micelios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* que causa la marchitez del garbanzo, en comparación con el control seguido de manera significativa por *T. harzianum* (73,33%) y *T. viride* (60%). Otro ensayo que consistió en utilizar tres agentes biológicos, *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* individualmente y en combinación para evaluar el potencial antagónico contra la germinación de esporas de *Helminthosporium maydis*, reveló que ninguno de los agentes biológicos individuales era eficaz para inhibir la germinación de esporas de *H. maydis* independientemente de sus concentraciones, sin embargo, el efecto combinado de *T. viride* + *T. harzianum* + *T. virens* mostró la germinación mínima (80%) que resultó en la máxima inhibición de la germinación (20%) sobre el registro que fue seguido por la combinación de *T. viride* junto con *T. harzianum* mostrando la germinación de la espora del 85% y la inhibición de la germinación del 15% (Jha, Kumar y Saleh, 2004). Así mismo Bustamante (2015), concluye en su investigación que un consorcio formado por especies nativas de *Trichoderma* y *T. harzianum*, resultan ser los mejores tratamientos frente al testigo y al tratamiento químico por su significancia estadística en el control de *Phytophthora infestan*, desarrollo de hojas y tallo en el cultivo de papa. Se pueden citar incluso que combinaciones

de cepas de *T. atroviride* con cepas bacterianas *Pseudomona chlororaphis* y *P. pseudoalcaligenes* mostraron un mejor control de la pudrición blanca de la raíz del aguacate, causada por *Rosellinia necatrix*, mientras que el resto de las combinaciones de *Trichoderma* y bacterias también redujeron significativamente el nivel de enfermedad e indujeron un retraso en el inicio de la enfermedad con respecto a las plantas de aguacate inoculadas con *Trichoderma* o bacterias (Ruano-Rosa *et al.*, 2014). Además, se observó un efecto de protección relativa de algunas combinaciones de *Trichoderma* y bacterias, mostrando siempre mejores resultados las combinaciones con antagonistas que cuando se evaluaban de manera individual, también como refiere Larthey *et al.* (2010) evaluó en medios culturales tres especies de *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. virens* encontrando que destruyen *Cercospora* en remolacha produciendo toxinas que matan antes del contacto físico.

Todos los ensayos anteriormente citados donde refieren que el mejor efecto es producto de combinar especies, se pudo corroborar en el tratamiento 6, que contenía las 3 especies de *Trichoderma* más el sustrato (mezcla de pajilla de maíz con residuos de arroz), el cual obtuvo diferencia significativa frente al control ( $p = 0.041$ ); Restrepo, Jaramillo y Cotes (2009) con respecto a la utilización de un sustrato, encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el testigo y *P. fluorescens* y los tratamientos con *T. harzianum*, micorrizas y el uso de viruta de pino, presentando una incidencia en raíces de 32%, 21% y 5%, 3% y 1% respectivamente, *T. harzianum*, micorrizas y viruta tuvieron los porcentajes severidad con niveles muy bajos de la enfermedad (producida por *Spongospora subterranea* en papa) de 0,22%; 0,088% y 0,019%, respectivamente; Esto debido a que *Trichoderma* es un género que se adapta y esporula en diferentes sustratos, así Rosas, Avalos, Rosas, Sánchez y Sampedro (2008), probaron diferentes sustratos encontrando que en donde mejor esporulación se presentó fueron: olote de maíz ( $2.42 \times 10^8$  esporas/ml),

rastrajo de maíz ( $2.02 \times 10^8$  esporas/ml) y cáscara de cacahuate ( $2.41 \times 10^8$  esporas/ml); a su vez Soto *et al.* (2005) usaron para la obtención del inóculo de hongos antagonistas, cáscara de arroz que favorece la rápida colonización y con escasos riesgos de contaminación, bajo costo y ser un producto de desecho; también recomienda bagacillo de caña, paja de caña triturada, cáscara de café, vainas de frejol, cáscara de trigo y residuos de torta de NIM, en los sustratos utilizados para la fermentación sólida, pudiendo obtener títulos de  $10^9$  conidios/g para *T. viride* y  $10^8$  conidios/g para *Gliocadium virens*.

Por lo tanto, la aplicación de *Trichoderma*, especialmente en forma de consorcio, es más útil que en forma individual como refiere kumar *et al.* (2014); sumado a la disponibilidad de un sustrato, que hizo mayor concentración de los biocontroladores en el suelo, además de las aplicaciones foliares en este bloque, todo esto mencionado y citado anteriormente generan factores de control; asimismo, Kumar *et al.* (2014) menciona que los patógenos vegetales establecen relaciones parasitarias entrando a través de cortes e infecciones como a la espermiosfera, Rizosfera y filosfera. Por lo tanto, la protección de los sitios vulnerables a la entrada y la infección de patógenos ofrecen un mejor medio para el manejo de enfermedades; además la inoculación al suelo o semillas puede dar lugar a que plantas enteras sean inducidas sistémicamente a ser resistentes a una variedad de patógenos. Al incorporar sustrato se obtiene una mejor colonización y como consecuencia, el control de enfermedades foliares probablemente puede lograrse mediante la aplicación de *Trichoderma* spp. sólo al suelo, como único biocontrol colonizando las raíces, este efecto ha sido demostrado con *Trichoderma* spp. y bacterias (Harman, Björkman, Ondik y Shores, 2008); también Yedidia *et al.* (1999), citado por Blaszczyk, Siwulski, Sobieralski, Lisiecka y Jędryczka (2014), encontró que la inoculación de raíces de pepino con esporas de *T. harzianum* indujo reacciones de resistencia en el conjunto plantas, lo que se relacionó con la mayor actividad de peroxidasa y quitinasa.

Por ello la presencia de sustrato influye en el incremento poblacional de los hongos, lo anteriormente citado refuerza el hecho de que el sustrato que se incorporo era pajilla de maíz y los restos de arroz, este último producto de la producción de los hongos; esto se resalta en el trabajo de Donoso, Lobos y Rojas (2008) donde indica por su parte, que la presencia de compost estimula un incremento poblacional del hongo *T. harzianum* y que la presencia conjunta de compost y *T. harzianum* permite un incremento significativo en altura y biomasa de plántulas de *Pinus radiata*, así como el desarrollo del sistema radical.

Se ha podido evaluar que el biocontrol de enfermedades es efectivo siempre y cuando sea preventivo o en un bajo nivel de daño. Es sumamente importante conocer las características fisiológicas del cultivo, la enfermedad a tratar y el biocontrolador. Esto indica que debemos preocuparnos de darle condiciones al microorganismo para que se desarrolle e inhiba el crecimiento del patógeno (Bettiol *et al.*, 2014). Más recientemente se ha encontrado que cepas específicas del hongo del género *Trichoderma* pueden colonizar y penetrar los tejidos de las raíces de las plantas, e inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las plantas, lo cual conlleva a la resistencia sistemática inducida de la planta (García *et al.*, 2006).

En estudios in vitro, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Chalara elegans* fueron fuertemente inhibidos por *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* y *T. koningii*, tanto cuando el patógeno como el antagonista se cultivaron en pares en el mismo medio agarizado y cuando se cultivaron en medios separados en un ambiente confinado. Estos resultados indican que la eficacia del control biológico de *Trichoderma* parece funcionar también a nivel atmosférico (efecto de los compuestos volátiles) sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo (Santamarina *et al.*, 2002).

## VII. CONCLUSIONES

- *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens*, aplicados foliarmente de forma individual y en conjunto no parecen controlar el desarrollo de *Cercospora asparagi* en el cultivo de espárrago en condiciones de campo.
- *T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens*, aplicados en conjunto foliarmente y al suelo, con un sustrato que también contenga el consorcio, reduce el desarrollo de *C. asparagi* en el cultivo de espárrago.
- *Trichoderma* es un género que puede ser utilizado en el manejo del patógeno *C. asparagi* en el cultivo de espárrago, aplicándose antes de la aparición de la enfermedad.
- *C. asparagi* pudo ser identificado en campo como en laboratorio, a través de sus características macro y microscópicas.
- La incidencia fue superior al 60% y severidad de hasta grado 3 en la primera evaluación de *C. asparagi* siendo estos índices altos en el cultivo de espárrago.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Los estudios en control biológico deben buscar mayor cantidad de agentes de biocontrol, para tener alternativas en diferentes condiciones medioambientales.
- Los factores en que se desenvuelven estos controladores (suelo, nutrición foliar, etc.) tienen que ser estudiados en su interacción con estos, para comprender aspectos de su funcionamiento.
- El estudio de estos controladores antagónicos, tiene que ser complementado con otros factores (sustratos, complementos nutricionales e inductores de resistencia), que puedan intervenir en su control para observar, comparar y complementar su uso, y así obtener resultados que se acerquen al óptimo deseado.
- Se tienen que evaluar diferentes concentraciones de esporas y periodos de aplicación para mejorar el accionar de estos hongos antagonistas.
- Las aplicaciones tienen que realizarse antes de que aparezca la infección, debido a que este patógeno (*C. asparagi*) es muy peligroso ya que su acción se produce en cortos períodos de tiempo.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdo, S. 1999. Fermentación en Estado Sólido (FES) de Hongos Filamentosos utilizando la cascarilla de arroz. Tesis de Magister en ciencias, pp. 30,31
- Acuña, J. 2006. "Evaluación *in vitro* de Tres Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. como Controlador Biológico de Aislados de *Stemphyllium vesicarium* Obtenidos de Espárrago". Tesis para el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca, Chile. pp. 24-26.
- AGRODATAPERÚ. 2018. Espárragos Frescos Perú Exportación 2018 noviembre. Recuperado el 10 enero del 2019 de:  
<https://www.agrodataperu.com/2018/12/esparragos-frescos-peru-exportacion-2018-noviembre.html>
- Alexopoulos, C. y Mims, C. 1985. Introducción a la Micología. Ediciones Omega-Barcelona, p. 544.
- Arzate, J., Michel, A., Domínguez, V. Santos, O. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) in vitro e Invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología ISSN: 0185-3309, Volumen 24, Número 2, pp. 98-100.
- Bettiol, W. 2006. Productos Alternativos para el Manejo de Enfermedades en Cultivos Comerciales. Fitosanidad vol. 10, no. 2, Ponencias Magistrales.
- Bettiol, W., Rivera, M., Mondino, P., Montealegre, J. y Colmenárez, Y. 2014. Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe. ISBN: 978-9974-0-1091-8, pp. 321, 322.

- Blaszczyk L., Siwulski M., Sobieralski K., Lisiecka J., Jędryczka M. 2014. *Trichoderma* spp. – Application and Prospects for use in Organic Farming and Industry. Journal of Plant Protection Research, Vol. 54, No. 4, p. 312.
- Bokhari, N. y Perveen, K. 2012. Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(44), pp. 7193-7197, 20.
- Bustamante A. 2015. Control Biológico del Tizón Tardío *Phytophthora infestans* en papa *Solanum tuberosum* a través de Consorcios Microbianos formados por Hongos Nativos del Género *Trichoderma* sp. Tesis, Universidad Politécnica Salesiana, p. 52.
- Cabrera, V. 2017. Análisis de los Factores de Producción en Espárrago en la Pampa de Villacurí. UNALM (Ica, Perú), p. 111.
- Calderón, M. 2004. “Presencia de Enfermedades Fungosas en el Cultivo de Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en la Península de Santa Elena, Guayas, Ecuador”. Tesis, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, p. 42.
- Castaño, J. 2005. Guía ilustrada de hongos promisorios para el control de malezas, insectos, nematodos y hongos fitopatógenos. Universidad de Caldas, 1 era edición, pp. 44,45.
- Chavarría E. 2006. Escalas Descriptivas para la Evaluación de Enfermedades de la Caña de Azúcar. Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar, Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar, pp. 26,27.
- Cruz A., Rivero D., Martínez B., Echevarría A. y Tania A. 2017. Evaluación de la Actividad Antifúngica de *Trichoderma asperellum* Samuels ante Patógenos Fúngicos que Afectan al Cultivo de la Soya (*Glycine max* L.). Cultivos Tropicales, vol. 38, no. 4, pp. 15- 21



- Donoso E., Lobos G., Rojas N. 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. BOSQUE 29(1): 52-57, p. 54.
- Dubey, S., Suresh, M., Singh, B. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. Biological Control, Volume 40, Issue 1, pp. 118–127, p. 118.
- Ellis M. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. International Mycological Institute Kew, Surrey, England, pp. 270,271.
- Esposito E. y da Silva M. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. Critical Reviews in Microbiology, 24(2):89-98.
- Ezziyyani M., Hamdache A., Requena A., Egea-Gilabert C., Candela M., González-Ramiro L. and Requena M. 2011. Mejora de la capacidad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de un combinado de antagonistas compatibles frente a *Phytophthora capsici* Leonian. Anales de Biología 33: 67-77, pp. 67,68.
- FAO. 2001. Guías sobre Buenas Prácticas para la Aplicación Terrestre de Plaguicidas. ISBN 92-5-304718-6, p. 13.
- Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos Antagonistas para el Control Fitosanitario. CATIE, Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 62 p.96-100.
- French, E., Hebert, T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Costa Rica, pp. 189,190.
- García, R., Riera, R., Zambrano, C. y Gutiérrez, L. 2006. Desarrollo de un Fungicida Biológico a Base de Una Cepa del Hongo *Trichoderma harzianum* Proveniente de la Región Andina Venezolana. FITOSANIDAD vol. 10, no. 2 de junio, pp. 115,116,117.

- Gómez, H. 2004. Aplicación de Hongos Entomopatógenos en el Control De Plagas. Min. Agricultura, SENASA, dirección de Sanidad Vegetal, pp. 57-60, Recuperado el 22 de abril del 2004 de:  
[http://www.muniate.gob.pe/ate/espacio/linea\\_verde/file/charlas-exposiciones-talleres/CHA-HONGOS-CONTROL-PLAGAS.pdf](http://www.muniate.gob.pe/ate/espacio/linea_verde/file/charlas-exposiciones-talleres/CHA-HONGOS-CONTROL-PLAGAS.pdf)
- Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M. y Torres, E. 2013. Manual de Producción y Uso de Hongos Antagonistas. Laboratorio de Antagonistas SCB – SENASA, Recuperado el 10 enero del 2018 de:  
<https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>
- Gonzáles, M. y del Pozo, A. 1999. El Cultivo del Espárrago. Boletín INIA Nº 6, ISSN 0717- 4829, Chile.
- Gonzáles, R. y López, C. 2012. Catálogo de las Plantas Vasculares de Ráquira (Boyacá), Flora Andina en un Enclave Seco de Colombia. Colombia Forestal Vol. 15 (1) :55. 103, p. 61.
- Google. (s.f.). [Mapa de Chíncha, Perú en Google maps]. Recuperado el 29 de enero del 2019, de:  
<https://www.google.com/maps/@13.5104611,76.1232817,1265m/data=!3m1!1e3?hl=es-419>
- Handelsman, J. y Stabb, E. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. American Society of Plant Physiologists, The Plant Cell, Vol. 8, 1855-1869, p. 1856.
- Harman, G., Björkman, T., Ondik, K. y Shores M. 2008. Changing Paradigms on the Mode of Action and Uses of *Trichoderma* spp. for Biocontrol. Department of Horticultural Sciences, Cornell University, Geneva, NY 14456, USA, p. 1.

- Haston, E., Richardson, J. E., Stevens, P. F., Chase, M. W., & Harris, D. J. 2009. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 128-131.
- Hermosa, M., Grondona, I., Iturriaga, A., Diaz, M., Castro C., Monte E. y Garcia I. 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5): 1890–1898.
- Ibarra V. 2015. Interacción de *Trichoderma* y *Glomus intraradices* en Plántulas de Maíz Inoculadas con Hongos Fitopatógenos. Tesis Doctorado, Colegio de Postgraduados – Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, p. 39.
- Infante, D., Martínez B., González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de Acción de *Trichoderma* Frente a Hongos Fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* Vol. 24 No. 1: 14-21.
- Instituto Peruano del Espárrago y Hortalizas. 2018. Boletín Informativo marzo 2018, Recuperado el 22 de abril de 2018, de:  
18-N%2003%20BOLETIN%20INFORMATIVO.pdf
- Jha, MM., Kumar, S., Saleh, H. 2004. Response of bioagents against maydis leaf blight of maize. *Annals of Biology*, ISSN: 0970-0153
- Julca, A., Julca N., Blas, R., Bello, S., Carhuallanqui R., Crespo R. 2008. Experiencias para el Manejo Integrado de *Cercospora nicotianae* Ellis & Everh en Tabaco negro, localidad de Juan Guerra. Tarapoto. Perú. Volume Nro° 1, Páginas 15-27. IDESIA (Chile), p. 20.
- Kubicek, C. y Harman, G. 1998. *Trichoderma* y *Gliocladium*, Taxonomy and Genetics. Vol 1 Basic Biology, pp. 14, 15, 22, 26, 29.

- Kumar S., Thakur M. and Rani A. 2014. *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. African Journal of Agricultural Research, Vol. 9(53), pp. 3838-3852, 31 December, pp. 3843,3844.
- Lartey, R., Ghoshroy, S., Caesar-TonThat, T., Lenssen, A., and Evans, R. 2010. Relations of *Cercospora beticola* with Host Plants and Fungal Antagonists. Agronomy Publications, Iowa State University, 66, pp 83.
- Leandro, G. y Soto, C. 1980. Evaluación de Fungicidas para el Combate de *Mycena citricolor* y *Cercospora coffeicola* en Café. Agron. Costarr. 4(1): 4145, p. 42.
- Limgroup. 2015. Limnews Marzo, *Cercospora asparagi*. Recuperado el 20 de abril del 2015 de:  
[archive.befve.com/userfiles/2015%2003%20Limnews%20mrt%20ES.pdf](http://archive.befve.com/userfiles/2015%2003%20Limnews%20mrt%20ES.pdf)
- Limgroup. 2013. Enfermedades y Plagas del Cultivo del Espárrago. Primera edición, p. 33, Recuperado el 20 de abril del 2014 de:  
<https://www.limgroup.eu/applications/limgroup-website/assets/books/es/>
- Linneo C. 1753. Species Plantarum. Impensis Laurentii Salvii, Vol.1, p. 313.
- Mahajan, K., Kumar, J. y Dhage, A. 2018. Evaluation of *Trichoderma* sp. against *Fusarium* Wilt of Chickpea Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* under in vitro Condition. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, Special Issue-7: 595-599
- Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. Vol. 28 No. 1 (2013): 1-11, pp. 3,4.
- Massaro, R. 2004. Tecnología para la Aplicación de Fungicidas Foliares en Soja con Equipos Terrestres. Revista Para Mejorar la Producción 27, INTA EEA Oliveros, p. 82.

- Maumary, R., Lenzi, D., Sillon, M. y Rista, L. 2002. Nuevas Patologías en Esparragueras de Santa Fe. Revista FAVE - Ciencias Agrarias 1 (2), p. 66.
- Michel, A. 2001. Cepas Nativas de *Trichoderma* spp (Eufungi:Hyphomycetes), su antibiosis y Micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales). Tesis Doctoral, Universidad de Colima – México. pp. 22, 110.
- Ministerio de Agricultura y Riego. 2018. Boletín Estadístico de Comercio Exterior Agrario, Mes de Enero. Sistema Integrado de Estadística Agraria.
- Monte E. and Llobell A. 2003. *Trichoderma* in Organic Agriculture. Proceedings V World Avocado Congress, p. 727.
- Núñez, E. 2005. Espárrago Peruano. Manejo Integrado de Plagas. SENASA, Lima-Perú, pp. 6,67.
- Phengsintham P., Chukeatirote E., McKenzie EHC, Hyde KD, Braun U. 2013. Monograph of Cercosporoid fungi from Laos. Current Research in Environmental & Applied Mycology. 3(1), 34–158, doi 10.5943/cream/3/1/2. pp. 50, 51.
- Pons N. 2007. *Cercospora apii* s. lat. en Venezuela. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2007, 24: 399-414, p. 402.
- Rehman S., Dar W., Ganie S., Bhat D., Mir Gh., Lawrence R., Narayan R. and Singh P. 2013. Comparative efficacy of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceris* causing wilt of chickpea. African Journal of Microbiology Research, Vol. 7(50), pp. 5731-5736, 18 December, p. 5732.
- Rengifo, H., Leguizamón, J. y Riaño, N. 2006. Incidencia y Severidad de la Mancha de Hierro en Plántulas de *Coffea arabica* en Diferentes Condiciones de Nutrición. Cenicafe, 57(3):232-242, p. 233.

- Restrepo A., Jaramillo S. y Cotes J. 2009. Efecto de dos Microorganismos y un Consorcio de Micorrizas en Combinación con Viruta de Pino sobre el Control de Sarna Polvosa (*Spongospora subterranea*) en Papa. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 62(2): 5047-5054, p. 5051.
- Rodríguez I., Flores J. 2018. Capacidad Antagónica In Vitro de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. Bioagro 30(1): 49-58.
- Rosas-Acevedo J., Avalos O., Rosas-Acevedo A., Sánchez-Infante A., Sampedro-Rosas L. 2008. Utilización de desechos orgánicos como sustrato para la producción de un fungicida natural en la región cafetalera del municipio de Tuxtepec, Oaxaca y Zihuatanejo, Gro. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, 4 (2): 256-258, p. 256.
- Ruano-Rosa D., Cazorla F., Bonilla N., Martín-Pérez R., De Vicente A. and López-Herrera C. 2014. Biological control of avocado white root rot with combined applications of *Trichoderma* spp. and rhizobacteria. Eur J Plant Pathol 138:751–762
- Sánchez G., Apaza W. 2000. Plagas y enfermedades del espárrago en el Perú. Instituto Peruano del espárrago y Hortalizas (IPEH), Lima Perú, pp. 107-112.
- Sánchez G., Sánchez J. 2008. Manejo Integrado del Cultivo del Espárrago en el Perú. IPEH, INCAGRO y UNALM, pp. 82,83.
- Santamarina, M., Roselló, J., Llacer, R. y Sanchis, V. 2002. Actividad antagonista de *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a hongos, bacterias e insectos in vitro. Revista Iberoamericana de Micología, España, Rev. 19: 99-103, p. 101.

- Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI). 2004. Boletín Meteorológico e Hidrológico del Perú. AÑO IV, Nº 06 JUNIO, pp. 13,14,17,18, 31, 33, 39 y 40.
- Soto L., Pérez M., Perera E., Castañeda R., Rodríguez N., González L., Viza R., Macías D., González N. 2005. Desarrollo y Utilización de *Trichoderma viride* y *Gliocadium virens* como Antagonistas de Hongos Fitopatógenos. Revista Agrotecnia de Cuba, p. 4.
- Stefanova, M. 2007. Introducción y Eficacia Técnica del Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. Fitosanidad ISSN: 1562-3009, vol. 11, no. 3, p. 76.
- Stevens, P.F. 2010. Angiosperm Phylogeny Website. Recuperado el 12 de mayo del 2017 de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Torres E., Iannacone J. y Gómez H. 2008. Biocontrol del Moho Foliar del Tomate *Cladosporium fulvum* Empleando cuatro Hongos Antagonistas. Bragantia, Campinas, v.67, n.1, pp.169-178, p. 173.
- Tovar J. 2008. Evaluación de la Capacidad Antagónica “*in vivo*” de Aislamientos de *Trichoderma* spp frente al hongo Fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Microbiología Agrícola y Veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana, Bogota-Colombia, p. 8.
- Ulloa M. y Herrera T. 1994. Etimología e Iconografía de Géneros de Hongos. 1ra Edición, Universidad Autónoma de México, Instituto de Biología.
- Waghunde R., Shelake R. and Sabalpara A. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. African Journal of Agricultural Research, Vol. 11(22), pp. 1952-1965, 2 June, p. 1956.
- Zavaleta, E. 2000. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Instituto de fitosanidad, colegio de postgraduados, México, pp. 202,203.

- Portal de Datos del Sistema Nacional de Datos Biológicos de la Argentina (SNDB). (s.f.). Recuperado el 29 de enero del 2019 de:  
<http://datos2010.sndb.mincyt.gob.ar/portal/species/browse/resource/36/taxon/2264249/>
- Publitours. (s.f.). Mapa de Ica; Recuperado el 29 de enero del 2019 de:  
<http://www.publitours.com/nazca-paracas-ica/mapa-de-ica.html>
- Servicio Nacional de Sanidad Agraria (s.f.). Procedimientos, Manuales, Fichas Técnicas, Perú, Recuperado el 29 de enero del 2019 de:  
<https://www.senasa.gob.pe/senasa/36558-2/>

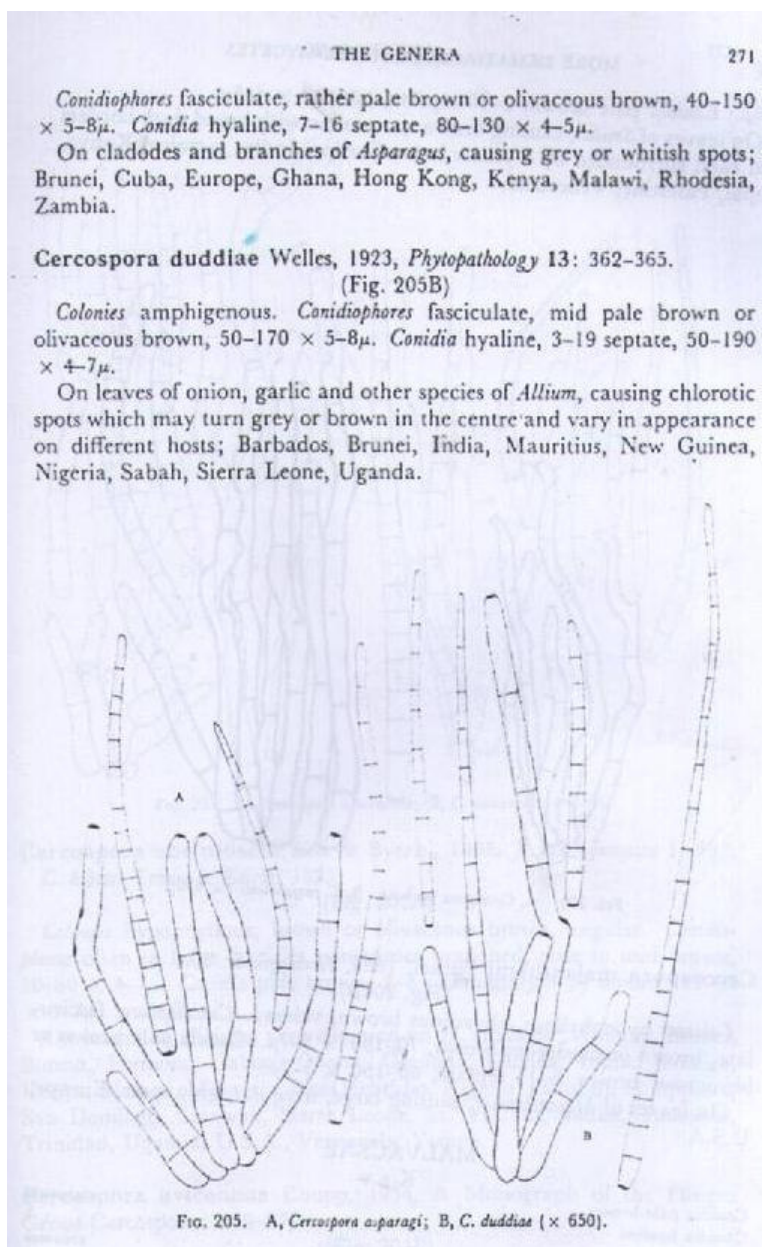


## X.- ANEXOS

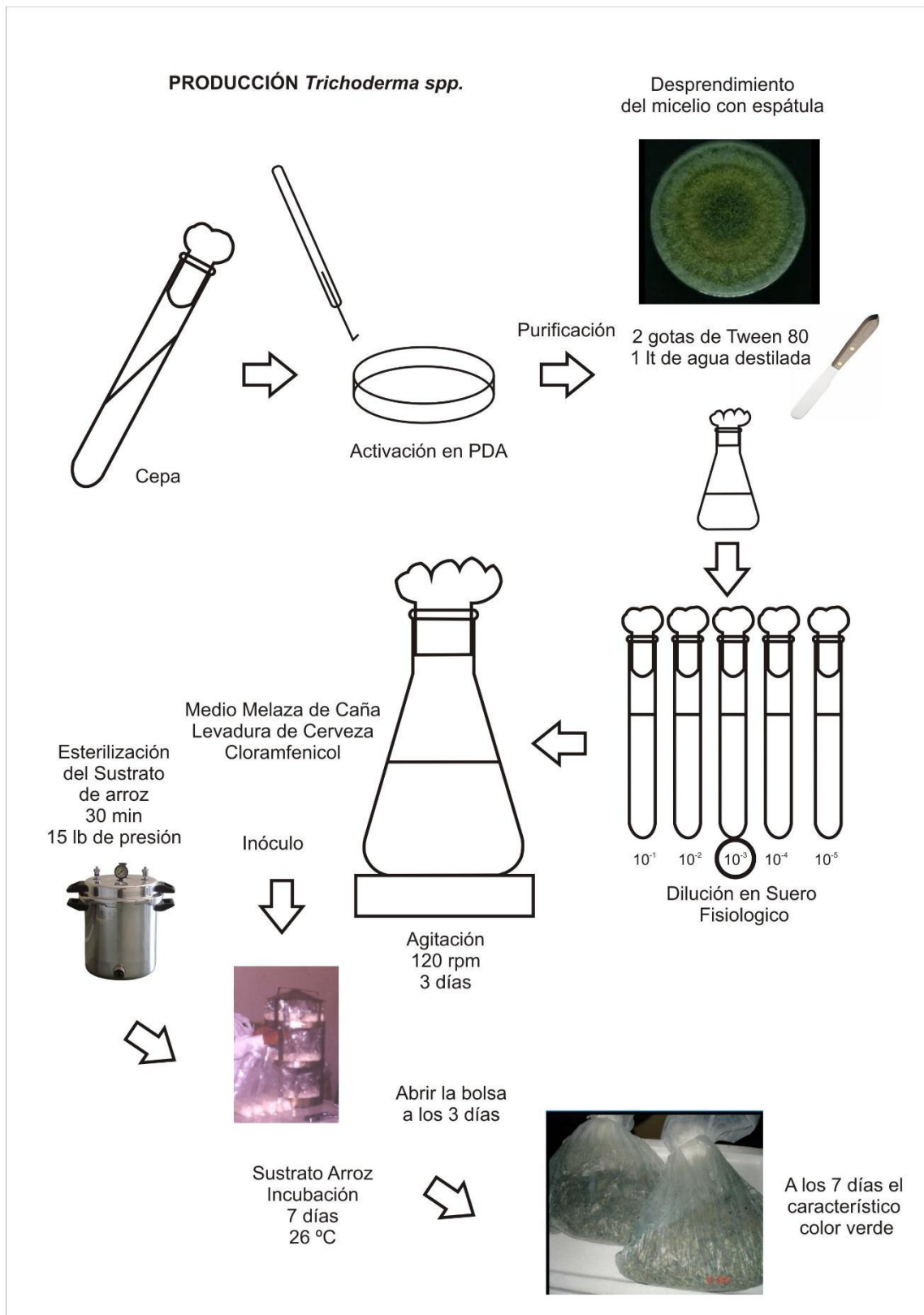
### Anexo 1. Clave para la Identificación de *Cercospora asparagi* (Ellis, 1976).

LILIACEAE	
KEY	
Conidia hyaline . . . . .	1
Conidia pale brown . . . . .	2
1. Conidia 4-5 $\mu$ thick . . . . .	<i>asparagi</i>
Conidia 4-7 $\mu$ thick, on <i>Allium</i> . . . . .	<i>duddiae</i>
2. Conidia 4-5 $\mu$ thick . . . . .	<i>zizilacis</i>
Conidia 5-7 $\mu$ thick . . . . .	<i>mojanthemis</i>

***Cercospora asparagi* Sacc., 1877, *Michelia* 1: 88-89.  
(Fig. 205A)**



**Anexo 2.** Protocolo de Producción de *Trichoderma* (Gómez *et al.*, 2013).



**Anexo 3a.** Clave para la identificación de *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. virens*  
(Kubicek, 1998).

Key to species in *Trichoderma* section *Trichoderma*

- 1(a) Colonies slow-growing, reaching less than 6 cm diam. in 7 days at 20°C . . . . . 2  
1(b) Colonies faster growing . . . . . 3

10

*Morphology and identification of Trichoderma*

- 2(a) Colonies yellow-green, floccose; phialides slender, almost *Verticillium*-like but curved; conidia obovoid with truncate base,  $3.0\text{--}5.0 \times 2.0\text{--}3.2 \mu\text{m}$  . . . . . 2. *Trichoderma aureoviride* anam. of *Hypocrea aureoviridis*  
2(b) Colonies green, granular, tardily sporulating; phialides flask-shaped; conidia ellipsoid,  $3.5\text{--}5.0 \times 2.0\text{--}2.6 \mu\text{m}$  . [*Trichoderma* anam. of *Podostroma alutaceum*]  
3(a) Conidia cylindrical,  $3.0\text{--}4.8 \times 1.9\text{--}2.8 \mu\text{m}$  . . . . . 4. *T. koningii* aggregate  
3(b) Conidia subglobose to short-ellipsoidal or ovate . . . . . 4  
4(a) Conidia ovate with truncate base,  $3.5\text{--}5.0 \times 2.5\text{--}3.2 \mu\text{m}$  . . . . . 5. *Hypocrea vinosa*  
4(b) Conidia subglobose to short-ellipsoidal . . . . . 5  
5(a) Fully mature conidia pale green,  $2.5\text{--}3.5 \times 2.1\text{--}3.0 \mu\text{m}$  . . . . . 3. *T. harzianum* aggregate  
5(b) Fully mature conidia becoming dark green . . . . . 6  
6(a) Fully mature conidia more or less roughened,  $3.6\text{--}4.5 \mu\text{m}$  diam. or  $4.0\text{--}4.8 \times 3.5\text{--}4.0 \mu\text{m}$  . . . . . 6. *T. viride* aggregate  
6(b) Fully mature conidia smooth-walled, usually  $2.6\text{--}3.8 \times 2.2\text{--}3.4 \mu\text{m}$  . . . . . 1. *T. atroviride*

Key to species in *Trichoderma* section *Pachybasium*

(modified from Bissett, 1991b)

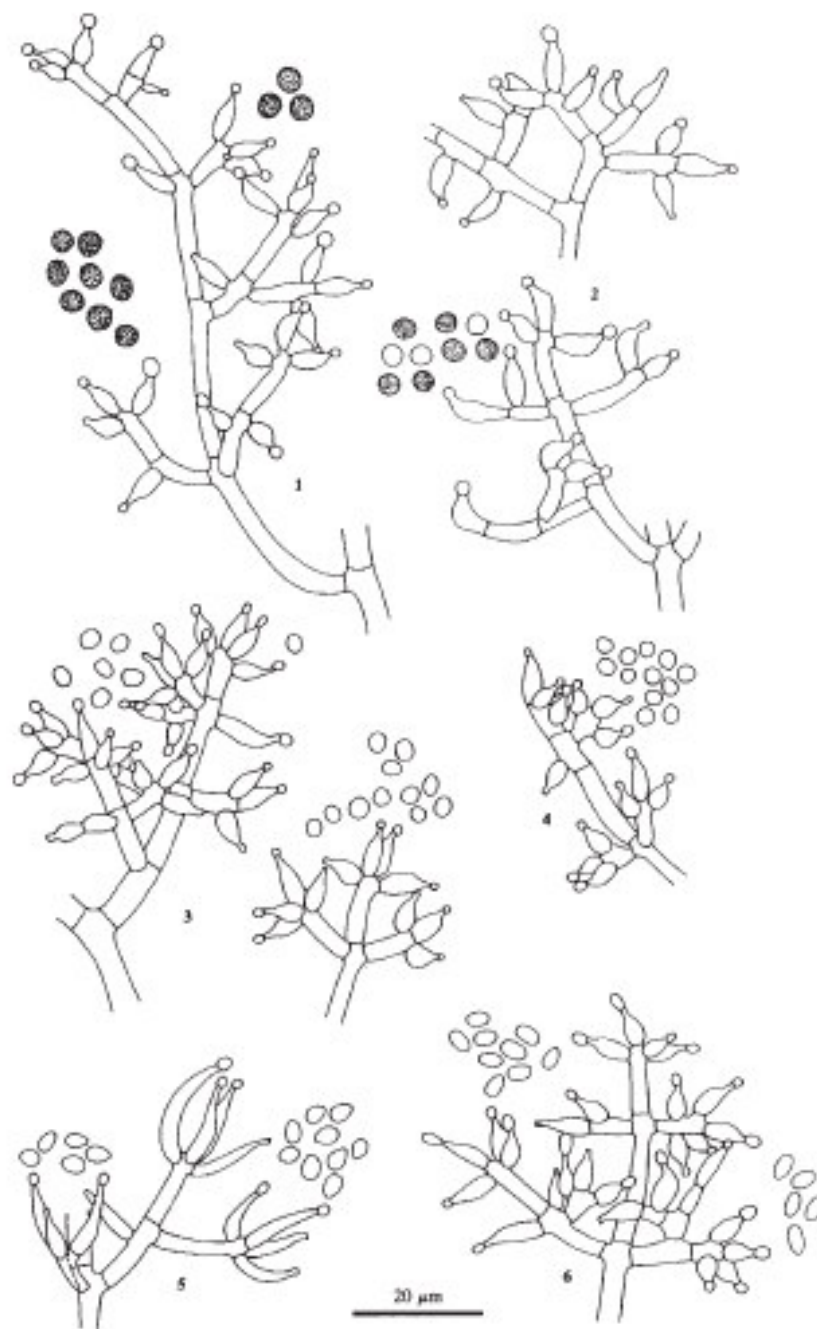
- 1(a) Conidiation entirely effuse, or conidiophores arranged in loosely organized flat pustules or small irregular fascicles; conidiophores sparingly branched with principal branches most often arising singly or paired [if conidia are hyaline, see 9(b)] . . . . . 2  
1(b) Conidiophores organized in compact, hemispherical to cushion-shaped pustules; conidiophores usually highly branched with branches 2–4-verticillate . . . . . 8  
2(a) Conidiophores arranged in fascicles up to 2 mm diam. . . . . 3  
2(b) Conidiophores effuse, or loosely arranged in flat pustules . . . . . 4  
3(a) Colonies less than 4 cm diam. after 4 days at 20°C; aerial hyphae more than  $1.5 \mu\text{m}$  wide; phialides convergent; chlamydospores infrequent; conidia  $2.5\text{--}4.5 \times 2.0\text{--}3.1 \mu\text{m}$  . . . . . 12. *Trichoderma* anam. of *Hypocrea gelatinosa*  
3(b) Colonies more than 4 cm diam. after 4 days; aerial hyphae mostly less than  $1.5 \mu\text{m}$  wide; phialides divergent; chlamydospores abundant in older mycelium; conidia  $2.9\text{--}4.0 \times 2.0\text{--}2.9 \mu\text{m}$  . . . . . 9. *T. fasciculatum*  
4(a) Conidia subglobose to obovoid, smaller than  $3.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ , rather pale green . . . . . 5  
4(b) Conidia broadly ellipsoidal, larger than  $3.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ , of other colour . . . . . 6  
5(a) Conidiation usually diffuse; phialides flask-shaped,  $5.5\text{--}7.5$  (in terminal position– $10 \times 2.5\text{--}3.2 \mu\text{m}$ , in divergent clusters of 3–5; conidia subglobose to short-obovoid,  $2.5\text{--}3.5 \times 2.1\text{--}3.0 \mu\text{m}$  . . . . . see 3. *T. harzianum* aggregate  
5(b) Conidiation more or less pustular but lacking sterile appendages; phialides broadly flask-shaped,  $4\text{--}5(7) \times 2.3\text{--}3.0 \mu\text{m}$ ; conidia subglobose,  $2.3\text{--}3.0 \times 2.0\text{--}2.6 \mu\text{m}$  . . . . . 14. *T. inhamatum*  
6(a) Conidia pale brown,  $3.0\text{--}5.3 \times 2.4\text{--}4.3 \mu\text{m}$  . . . . . 11. *T. flavofuscum*  
6(b) Conidia dark green . . . . . 7  
7(a) Conidiophores aggregated into flat pustules on MA, usually with sterile apical elongations; phialides divergent; conidia  $3.7\text{--}5.3 \times 2.6\text{--}3.7 \mu\text{m}$  . . . . . 7. *T. crassum*  
7(b) Conidiation entirely effuse, or conidiophores lacking sterile apical elongations; phialides convergent in penicillate manner; conidia  $3.5\text{--}6.0 \times 2.8\text{--}4.1 \mu\text{m}$  . . . . . 26. *T. virens*

11



**Anexo 3b.** Clave Morfológica de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* (Kubicek, 1998).

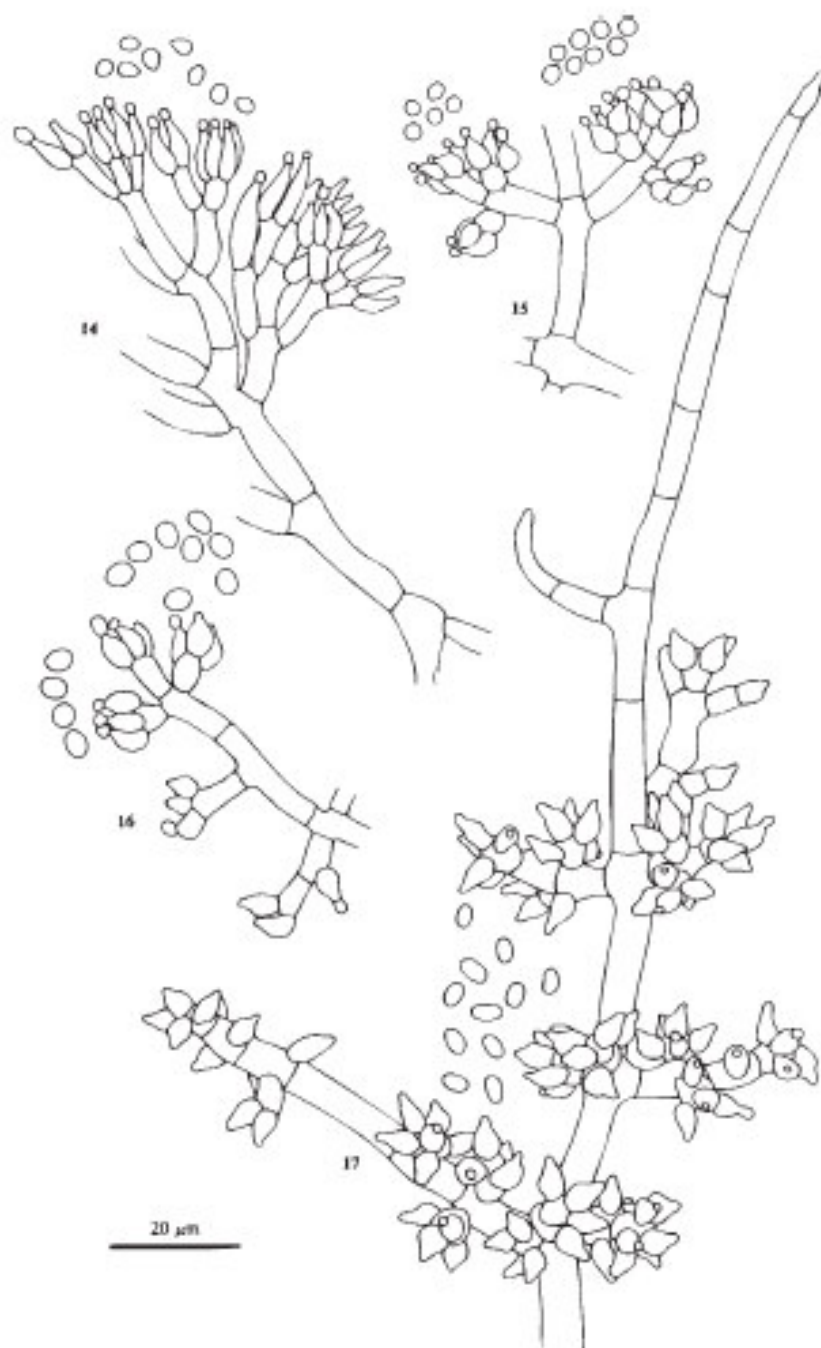
*Trichoderma and Gliocladium-vol. 1*



**Figures 1.1 to 1.6** *Trichoderma* sect. *Trichoderma*. 1. *T. viride*, CBS 189.79. 2. *T. atroviride*, CBS 351.93. 3. *T. harzianum*, CBS 226.95. 4. *T. inhamatum*, CBS 274.72. 5. *T. aureoviride*, CBS 283.79. 6. *T. koningi*, CBS 457.96.

**Anexo 3c.** Clave Morfológica de *Trichoderma virens* (Kubicek, 1998).

*Morphology and identification of Trichoderma*



Figures 1.14 to 1.17 *Trichoderma* sect. *Pachybasium*. 14. *H. gelatinosa*, CBS 724.87. 15. *T. piluliferum*, CBS 224.84. 16. *T. virens*, CBS 497.84. 17. *T. oblongisporum*, DAOM 167085 (redrawn from Blissett, 1991b).

**Anexo 4.** Material para preparar los Hongos (a) e inocular el sustrato (b).



**Anexo 5.** Acondicionamiento para la aplicación de *Trichoderma* (Gómez, 2004).

**Procedimiento para el preparado de la producción de hongos benéficos**



Medir el pH del agua que se usará para diluir el hongo. Verificar que la dureza no sea mayor de 150 ppm y el PH de 5 a 7. Corregir el pH y la dureza si fuera necesario.

Abrir la bolsa y agregar 50 ml de un coadyuvante agrícola, agregar el agua preparada y agitar hasta que las esporas del hongo se desprendan del arroz. Este procedimiento se realiza con todas las bolsas a usar.

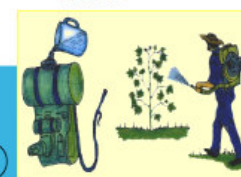


Colar para separar las esporas del arroz. Asegúrese de que el arroz quede bien lavado.



La solución de esporas obtenida se agrega al cilindro y se pone al equipo de aplicación. Agitar antes de llenar el equipo de aplicación. El arroz sobrante dispersarlo en forma granulada al pie de la planta.

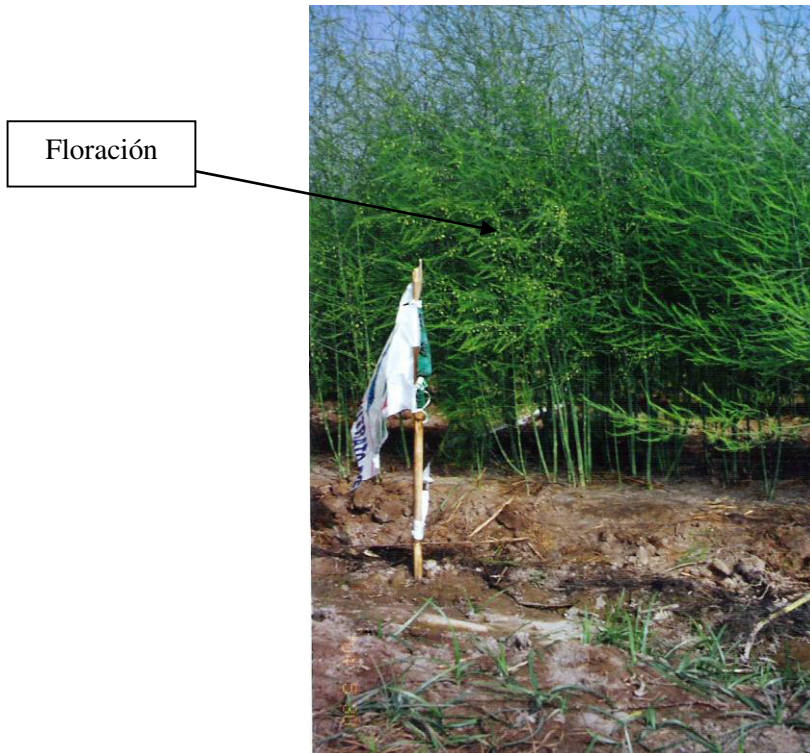
Aplicar por aspersión dirigida a las zonas donde se encuentre la plaga hasta que se acabe el biopreparado.



**SE RECOMIENDA EL USO DE MOCHILAS NUEVAS DE USO EXCLUSIVO PARA BIOPREPARADOS.**



**Anexo 6.** Etapa fenológica con desarrollo de floración, también se observa la banderilla que delimita los tratamientos en el ensayo.



**Anexo 7.** Desarrollo de la planta y partes del ensayo.

